



BACHELORARBEIT

Frau
Judith Rasser

**Charakterisierung von
isothermalen
Amplifikationsmethoden für die
Anwendung in einem
diagnostischen Teststreifensystem**

Mittweida, 2012

**Fakultät
Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik**

**Charakterisierung von isothermalen
Amplifikationsmethoden für die
Anwendung in einem diagnostischen
Teststreifensystem**

Autor:
Frau Judith Rasser

Studiengang:
Biotechnologie/ Bioinformatik

Seminargruppe:
BI09-w2

Matrikelnummer:
23624

Erstprüfer:
**Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde
(Hochschule Mittweida)**

Zweitprüfer:
**Dr. Dirk Kuhlmeier
(Fraunhofer Institut für Zelltherapie und
Immunologie)**

Einreichung:
Mittweida, 31.08.2012

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2012

Bibliographische Beschreibung

Rasser, Judith: Charakterisierung von isothermalen Amplifikationsmethoden für die Anwendung in einem diagnostischen Teststreifensystem. – 2012 – 6, 56, 4 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/ Naturwissenschaften /Informatik, Bachelorarbeit, 2012.

Kurzbeschreibung

In dieser Arbeit wurden die zwei isothermalen Amplifikationsmethoden Recombinase Polymerase Amplification und Loop-mediated isothermal amplification hinsichtlich ihrer Anwendung in einem diagnostischen Teststreifensystem analysiert. Des Weiteren wurden die Bindungseigenschaften des Proteins RecA untersucht, um dieses zur Hybridisierung einer Sonde in ein amplifiziertes Produkt zu nutzen. Dadurch soll die Spezifität der Amplifikationsmethode erhöht werden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Dirk Kuhlmeier bedanken, der durch seine vielen wertvollen Anregungen im Rahmen gemeinsamer Diskussionen und seine ständige Hilfsbereitschaft sehr zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat. Für das gute fachliche und soziale Arbeitsumfeld danke ich der ganzen Arbeitsgruppe Nanotechnologie am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dirk Labudde, für die Betreuung meiner Bachelorarbeit von Seiten der Hochschule Mittweida und für die engagierte Unterstützung während des gesamten Studiums.

Auch meinen Eltern und Großeltern möchte ich Danken, nicht nur für die finanzielle Unterstützung, sondern auch für den moralischen Beistand. Ihr habt mir sehr viel Kraft gegeben und ohne euch wäre das Studium nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 DNA-Teststreifensystem	2
1.2 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	2
1.3 Recombinase Polymerase Amplification (RPA)	4
1.4 RecA	6
2 Zielsetzung	8
3 Material	9
3.1 Chemikalien	9
3.2 Verwendete Oligonukleotide	10
3.3 Molekularbiologische Reagenzien	11
3.4 Verwendete Puffer	12
3.5 Kommerzielle Testkits	12
3.6 Geräte	13
4 Methoden	14
4.1 PCR	14
4.1.1 Referenz-PCR.....	14
4.1.2 Herstellung amplifizierter Produkte.....	14
4.2 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	15
4.2.1 Visualisierung der LAMP mit Calcein.....	15
4.2.2 Visualisierung der LAMP mit HNB.....	16
4.2.3 Optimierung der LAMP durch zwei weitere Primer	16
4.3 Recombinase Polymerase Amplification (RPA)	16
4.3.1 Denaturierung störender Proteine	17
4.3.2 Nachweisgrenze	18
4.3.3 Temperaturgradient.....	19
4.3.4 Reaktionszeit	19
4.3.5 SATamra-Sonde	19

4.3.6	Lagerungsstabilität	21
4.4	RecA	21
4.4.1	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	22
4.4.2	Nachweis markierter Oligonukleotide auf silanisierten und Streptavidin- beschichteten Objektträgern.....	24
4.4.3	Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore™-Technik).....	28
5	Ergebnisse.....	32
5.1	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	32
5.1.1	Visualisierung der LAMP mit Calcein.....	33
5.1.2	Visualisierung der LAMP mit HNB	33
5.1.3	Optimierung der LAMP durch zwei weitere Primer	34
5.2	Recombinase Polymerase Amplification (RPA)	35
5.2.1	Denaturierung störender Proteine	35
5.2.2	Nachweisgrenze	36
5.2.3	Temperaturgradient.....	37
5.2.4	Reaktionszeit	37
5.2.5	SATamra-Sonde	38
5.2.6	Lagerungsstabilität	38
5.3	RecA	40
5.3.1	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	40
5.3.2	Nachweis markierter Oligonukleotide auf silanisierten und Streptavidin- beschichteten Objektträgern.....	42
5.3.3	Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore™-Technik).....	43
6	Diskussion.....	49
6.1	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	49
6.2	Recombinase Polymerase Amplification (RPA)	50
6.3	RecA	51
7	Ausblick.....	54
8	Zusammenfassung.....	55
	Literaturverzeichnis	57
	Selbstständigkeitserklärung	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Bindungsstellen der LAMP-Primer	2
Abbildung 2 Reaktionsprinzip der LAMP	4
Abbildung 3 Reaktionsprinzip der RPA	5
Abbildung 4 katalytische Aktivität der RecA.....	7
Abbildung 5 Aufbau und Detektionsprinzip der SATamra-Sonde.....	20
Abbildung 6 Prinzip der Sondenhybridisierung durch die RecA	22
Abbildung 7 Schema der Streptavidinbeschichtung von Objektträgern.....	24
Abbildung 8 Bindung eines markierten PCR-Produkt an einem streptavidi-beschichteten Objektträger	25
Abbildung 9 Stabilisierung der hybridisierten Sonde	27
Abbildung 10 Aufbau und Detektionsmechanismus der BIAcore™-Technik	29
Abbildung 11 Elektrophoresegel einer LAMP	32
Abbildung 12 Nachweisgrenze einer LAMP mit Calcein im Vergleich zur PCR.....	33
Abbildung 13 Detektion einer LAMP mit Hydroxynaphtholblau	34
Abbildung 14 Real-Time-LAMP mit vier Primern und mit sechs Primern	35
Abbildung 15 Elektrophoresegel nach Applikation unterschiedlicher Denaturierungsmethoden.....	36
Abbildung 16 Nachweisgrenze der RPA im Vergleich zur PCR	36
Abbildung 17 Elektrophoresegel einer Gradienten-RPA	37
Abbildung 18 Elektrophoresegel von RPAs bei unterschiedlichen Inkubationszeiten.....	37
Abbildung 19 Real-Time-RPA mit der SATamra-Sonde	38
Abbildung 20 Lagerungsstabilität nach vier Wochen	39
Abbildung 21 Lagerungsstabilität nach acht Wochen	39
Abbildung 22 Elektrophoresegel eines EMSA mit und ohne RecA-Puffer.....	40
Abbildung 23 EMSA mit den einzelnen Bestandteilen des RecA-Puffers.....	41
Abbildung 24 Vergleich der elektrophoretischen Mobilität in RecA-Puffer, HEPES-Puffer und ohne Puffer.....	41
Abbildung 25 Nachweis eines Biotin- und Cy3- markierten PCR-Produkts	42
Abbildung 26 Einbaus einer Fluoreszenzsonde in PCR-Produkt durch die RecA	43
Abbildung 27 Einbau einer Fluoreszenzsonde durch die RecA, stabilisiert durch RNA....	43
Abbildung 28 Beispiel eines Sensogramms zur Aktivierung der Sensoroberfläche und Immobilisierung der Oberfläche mit DNA.....	44
Abbildung 29 Sensogramm unterschiedlicher RecA-Konzentrationen	45
Abbildung 30 Vergleich der Bindung mit spezifischer und unspezifischer Sonde.....	46
Abbildung 31 Einfluss der Bindungskinetik durch stabilisierende RNA	46

Abbildung 32 Bindungskinetik der RecA an ssDNA	48
--	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien	9
Tabelle 2 Verwendete Oligonukleotide	10
Tabelle 3 Molekularbiologische Reagenzien	11
Tabelle 4 Inkubationsbedingung der PCR	14
Tabelle 5 Bestandteile eines RPA-Ansatzes.....	17
Tabelle 6 Probenaufbereitung der unterschiedlichen Denaturierungsverfahren.....	18
Tabelle 7 Reaktionsansätze der RPA zur Bestimmung der Nachweisgrenze	18

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenverhältnis
(w/v)	Verhältnis Masse zu Volumen
ATPES	3-Aminopropyl-triethoxysilan
ATPyS	Adenosin 5'-[Y-thio] triphosphate tetralithium salt
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
Bst Pol	<i>Bacillus stearothermophilus</i> DNA Polymerase
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA (double-stranded)
DTT	Dithiothreitol
EDC	N-Ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HNB	Hydroxynaphtholblau
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MRSA	<i>Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	optische Dichte
OT	Objektträger
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
RecA	Recombinase A
RPA	Recombinase Polymerase Amplification
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RT	Raumtemperatur
RTq-PCR	Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction
RU	Resonance Unit

SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
ssDNA	einzelsträngige DNA (single-stranded)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	enzymatische Einheit (Unit)
UV	ultraviolett
V	Volumen
v	elektrische Spannung (Volt)

1 Einleitung

Ein schneller und präziser Erregernachweis ist bei vielen Krankheitsbildern besonders wichtig, um frühzeitig mit einer gezielten Therapie beginnen zu können. Konventionell erfolgt die Bestimmung der Krankheitserreger über die Kultivierung auf Nährmedien mit anschließender biochemischer Analyse. Dieses Verfahren kann mehrere Tage in Anspruch nehmen, da sich viele Mikroorganismen nur schwer anzüchten lassen. Daher erfolgt die Identifikation der Erreger immer häufiger anhand eines DNA-Nachweises. Dazu wird die DNA aus dem Untersuchungsmaterial extrahiert, amplifiziert und am Ende das Produkt visualisiert. Die am häufigsten genutzte Nukleinsäureamplifikationsmethode ist die PCR, bei der die Vervielfältigung der DNA in verschiedenen lang andauernden Temperaturzyklen erfolgt. Zuerst muss der DNA-Doppelstrang denaturiert werden, dann erfolgt die spezifische Anlagerung der Primer und zuletzt die Kettenelongation. Neueste Entwicklungen in der molekularen DNA-Synthese zeigen viele verschiedene isothermale Amplifikationsmethoden, also DNA-Vervielfältigungstechniken, die bei einer konstanten Temperatur ablaufen und weniger Zeit beanspruchen. Eine dieser isothermale Amplifikationsmethoden soll später für die Anwendung in einem DNA-Teststreifensystem genutzt werden. In diesem soll die DNA amplifiziert und anschließend auch detektiert werden können. Das zu entwickelnde Teststreifensystem soll die DNA von potentiell pathogenen Erregern aus unterschiedlichen Probenmaterialien vervielfältigen und das Ergebnis anzeigen. Dazu soll die zuvor aufgereinigte Probe in das System injiziert werden. In der ersten Reaktionskammer erfolgt die Amplifikation der DNA mittels einer isothermalen Amplifikationsmethode. Nachdem diese Reaktion abgeschlossen ist, wird die Probe, falls notwendig, in eine zweite Reaktionskammer überführt, in welcher die Detektion stattfindet. Mögliche Mechanismen der Detektion sind die Messung eines Fluoreszenzsignals, eine Farbreaktion, sowie ein Lateral Flow Assay.

1.1 DNA-Teststreifensystem

Derzeit sind verschiedene DNA-Teststreifen auf dem Markt, mit denen es möglich ist, DNA zu detektieren. Zum Beispiel bietet die Firma Milenia Biotec GmbH ein Lateral Flow Assay an, mit dem FITC- und Biotin- markierte PCR-Produkte nachgewiesen werden können. Die Amplifikate binden an die mit Gold markierten FITC-spezifischen Antikörper im Probenauftrag. Dieser Komplex diffundiert über den immobilisierten Biotin-Liganden auf dem Teststreifen und kann über die Biotinmarkierung des Produktes gebunden werden. Dadurch bildet sich eine rot-blaue Testbande aus. Nicht abgefangene Goldpartikel überströmen die Kontrollbande und werden dort durch Spezies-spezifische Antikörper gebunden [Hillebrand et al, 2010]. Auch die Firma Hain Lifescience GmbH hat ein Detektionssystem für DNA entwickelt. Dabei wird das PCR-Produkt thermisch denaturiert und mit spezifischen Sonden, die eine Bindungsstelle für Gold- besitzen, hybridisiert. Auf dem Teststreifen wird dieser Komplex mit Gold markiert und lagert sich an eine spezifische Bindungsstelle auf dem Teststreifen an. Diese Reaktion führt zu einer sichtbaren Bande auf dem Streifen.

1.2 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

LAMP ist eine neue Amplifikationsmethode, die im Gegensatz zur PCR bei gleichbleibender Temperatur stattfindet. Somit sind keine unterschiedlich lang andauernden Temperaturzyklen notwendig, die Vervielfachung der DNA wird bei einer konstanten Temperatur von 65 °C erreicht. Für die LAMP sind vier Primer notwendig, die sechs definierte Zielsequenzen auf dem DNA-Template besitzen. Das richtige Primer-Design ist entscheidend für die Durchführung der Amplifikation. Die Bindungsstellen der LAMP-Primer sind in Abbildung 1 dargestellt.

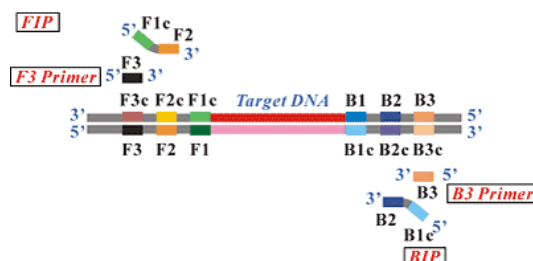


Abbildung 1 Bindungsstellen der LAMP-Primer [Tomita et al, 2008]

Für die Funktionalität der Primer müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt werden, so muss der Abstand zwischen dem F2-Primer und dem B2-Primer zwischen 120 und 180 bp liegen und der Abstand zwischen F2 und F3 sowie B2 und B3 zwischen 0-20 bp. Der Abstand zwischen den schleifen-bildenden Bereichen muss zwischen 40 bp und 60 bp betragen. Der Schmelzpunkt der Primer muss bei GC-reichen Zielsequenzen zwischen 60-65 °C liegen und bei AT-reichen Sequenzen zwischen 55-60 °C. Der GC-Gehalt der Primer richtet sich nach dem GC-Gehalt der Zielsequenz, bei GC-reichen Sequenzen soll er zwischen 50-60 % liegen und für normale und AT-reiche-Sequenzen zwischen 40-50 %. Für das spezielle Primer-Design der LAMP-Amplifikation gibt es ein Online-Tool, mit dem anhand der Zielsequenz die vier Primer ausgegeben werden können. (<http://primerexplorer.jp/e/index.html>). Für die Amplifikation wird neben den vier Primern eine spezielle Polymerase benötigt. Als geeignet wurde die Bst-Polymerase (*Bacillus stearothermophilus*) identifiziert. Sie polymerisiert in 5' - 3' Richtung und hat keine Exonuclease-Aktivität in 3' – 5' Richtung, außerdem besitzt sie eine Strangverdrängungsaktivität, wodurch sie in der Lage ist, auch doppelsträngige DNA zu amplifizieren, indem sie den ursprünglich komplementären Strang verdrängt. Dadurch muss die DNA nicht auf 95 °C erhitzt werden, um durch Denaturierung Einzelstränge zu erhalten. Bei 65 °C befindet sich die DNA in einem semistabilen Zustand, dadurch kann einer der Primer an die Zielsequenz binden und die DNA Synthese initialisieren (Abb. 2a). Die Polymerase startet die Neusynthese des komplementären Stranges unter Verdrängung des ursprünglichen Stranges (Abb. 2b). Da der erste angelagerte Primer zwei unterschiedliche Bindungsstellen besitzt, die auf der Zielsequenz nicht direkt nebeneinander liegen, bildet sich ein Überhang, an dem sich der zweite Primer anlagert und die Polymerase einen neuen Strang synthetisieren kann (Abb. 2c). Als Resultat entsteht ein Doppelstrang und der verdrängte Einzelstrang (Abb. 2d). Der Einzelstrang bildet am 5'-Ende einen Loop, da der Primerüberhang an seine Zielsequenz binden kann (Abb. 2e). Am 3'-Ende läuft simultan die gleiche Reaktion ab, sodass am Ende ein Einzelstrang entsteht, der an beiden Enden eine Loopregion besitzt (Abb. 2f). Diese Struktur dient als Ausgangspunkt für den Amplifikationszyklus im LAMP-Verfahren. An den beiden Enden kann die Polymerase die Strangsynthese beginnen. Die Loop-Regionen sind einzelsträngig, dadurch können sich auch dort Primer anlagern und die Strangsynthese initialisieren. Am Ende entstehen viele unterschiedlich lange DNA- Stücke [Tomita et al, 2008].

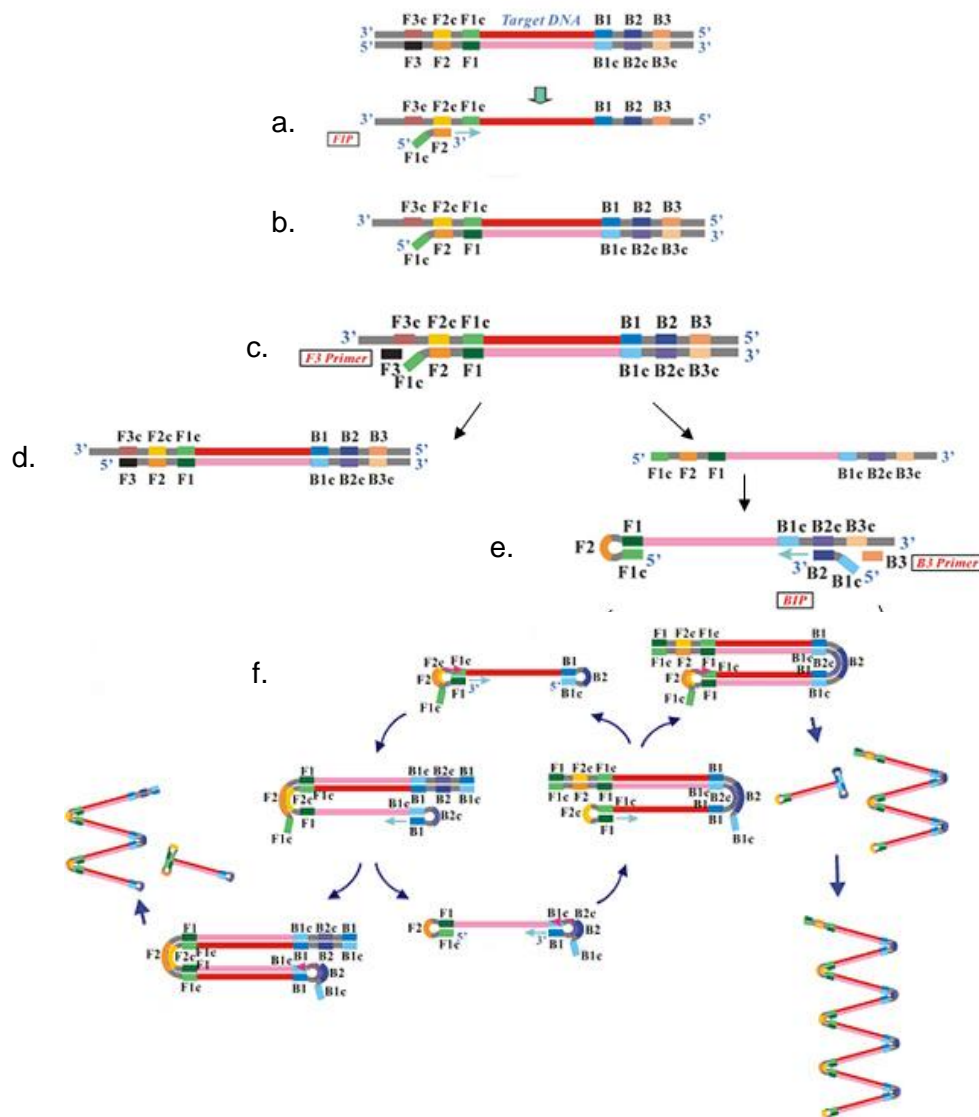


Abbildung 2 Reaktionsprinzip der LAMP [Tomita et al, 2008]

Bei 65 °C befindet sich die DNA in einem semistabilen Zustand, dadurch kann einer der Primer an die Zielsequenz binden und die DNA Synthese initialisieren (Abb. 2a). Die Polymerase startet die Neusynthese des komplementären Strangs unter Verdrängung des ursprünglichen Stranges (Abb. 2b). Am Überhang bindet ein zweiter Primer (Abb. 2c). Es entsteht ein Doppelstrang und der verdrängte Einzelstrang (Abb. 2d). Der Einzelstrang bildet am 5'-Ende einen Loop, (Abb. 2e). Am 3'-Ende läuft simultan die gleiche Reaktion ab, sodass am Ende ein Einzelstrang entsteht, der an beiden Enden eine Loopregion besitzt (Abb. 2f). Diese Struktur dient als Ausgangspunkt für den Amplifikationszyklus in dem LAMP-Verfahren.

1.3 Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

Die RPA ist eine isothermale Amplifikationsmethode, die bei einer konstanten Temperatur von nur 37 °C abläuft. Für die Durchführung der RPA werden ein forward und ein reverse Primer benötigt. Die RPA-Primer unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Länge von PCR-Primern, die optimaler Weise zwischen 30 und 35 Nukleotiden liegen soll. Der GC-Gehalt sollte zwischen 40 % und 60 % betragen. Lange Aneinanderreihungen gleicher Basen

(Homopolymere) sollten vermieden werden, sowie das Auftreten von Palindromen und direkten und invertierten Wiederholungen. Grundlagen der RPA-Reaktion bilden das Enzym Recombinase, Einzelstrangbindende Proteine und eine Polymerase mit Strangverdrängungsaktivität. Das Grundprinzip ist in Abbildung 3 dargestellt und ähnelt einer herkömmlichen PCR. Die von T4-Phagen abgeleitete UvsX-Recombinase und deren Co-Faktor die UvsY bilden mit den Oligonukleotidprimern einen Komplex. Durch diese als Recombinasefilament bezeichnete Verbindung kann der Primer seine Zielsequenz erkennen und an die Doppelstrang-DNA binden (Abb. 3a). Die an den Primer angelagerte Recombinase spaltet den DNA-Doppelstrang auf, dadurch ist eine Denaturierung der DNA nicht notwendig. Der dabei entstandene Einzelstrang wird durch einzelstrangbindende Proteine stabilisiert (Abb. 3b). Dadurch kann sich die *Sau* Polymerase (*Staphylococcus aureus*) anlagern und die Synthese eines neuen Stranges unter Verdrängung des ursprünglichen Stranges initialisieren (Abb. 3c). Die Synthese erfolgt kontinuierlich in beide Richtungen (Abb. 3d). Als Resultat entstehen zwei komplementäre Doppelstränge (Abb. 3e) [Piepenburg et al, 2006].

a. Bildung eines Recombinase-Primer-Komplex und Anlagerung an Zielsequenz

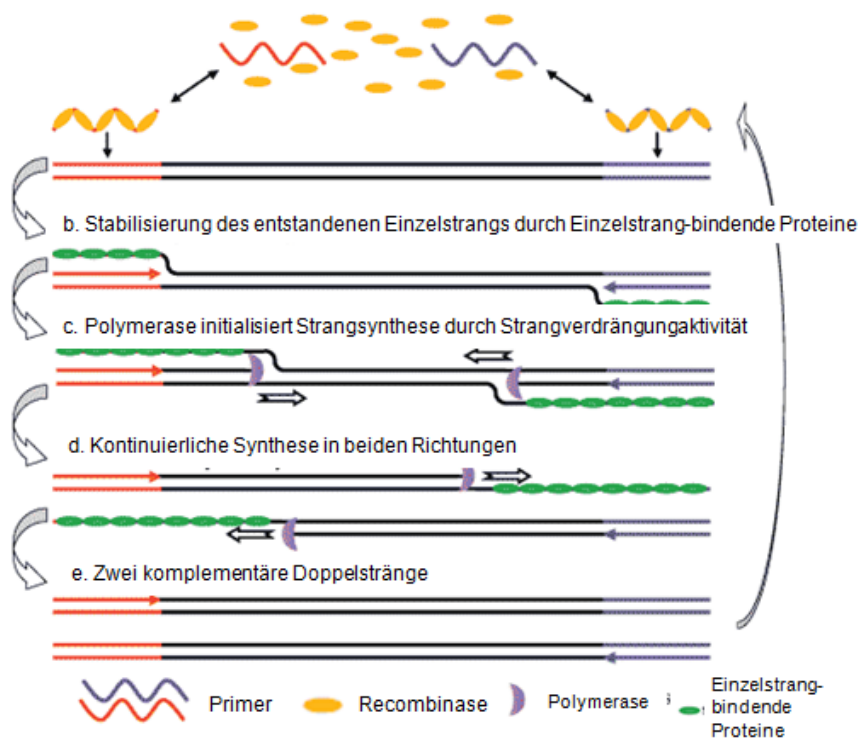


Abbildung 3 Reaktionsprinzip der RPA [Piepenburg et al, 2006]

Zuerst bildet sich um die Primer ein Komplex aus Recombinase, wodurch die Primer in der Lage sind ihre Zielsequenz zu erkennen und zu binden (Abb. 3a). Die an den Primer angelagerte Recombinase spaltet den DNA-Doppelstrang auf und der dabei entstandene Einzelstrang wird durch Einzelstrangbindende Proteine stabilisiert (Abb. 3b). Dadurch kann sich die Polymerase anlagern und die Synthese eines neuen Stranges unter Verdrängung des ursprünglichen Strangs initialisieren (Abb. 3c). Die Synthese erfolgt kontinuierlich in beiden Richtungen (Abb. 3d). Als Resultat entstehen zwei komplementäre Doppelstränge (Abb. 3e).

1.4 RecA

Das RecA-Protein von *Escherichia coli* ist ein multifunktionelles Protein, das entscheidend bei drei verschiedenen, aber verwandten biologischen Prozessen, eine Rolle spielt. Zum einen ist es an der allgemeinen genetischen Rekombination beteiligt, sowie bei der Regulierung der koordinierten Expression vieler ungebundener Gene als Reaktion auf DNA-Schäden (SOS-Reaktion). Sie ist ebenfalls bei der Umgehung fehleranfälliger replikativer DNA-Läsionen beteiligt, was zu einer stark mutagenen Reparatur der DNA führt. Die RecA besitzt drei wesentliche Aktivitäten, das sind zum einen die homologe Paarung und der Austausch von DNA. Die DNA-Strangverdrängungsaktivität ist ein biologischer Prozess, in dem sich zwei homologe DNA-Moleküle aneinander binden und ein Austausch dieser DNA-Region stattfindet. Die Co-Protease-Aktivität ist eine weitere Eigenschaft des RecA-Proteins, die zur ATP- und DNA-abhängigen posttranslationalen Modifikation von Proteinen führt. Es ist eine sehr spezifische Selbstspaltung von Proteinen, die abhängig von ATP und einzelsträngiger DNA ist. [Bianco et al 1998]. Die RecA enthält zwei DNA-Bindungsstellen, eine für die Bindung an ssDNA und die andere für die Bindung von Doppelstrang-DNA. Des Weiteren besitzt sie eine ATP-Bindungsstelle. Die Bindung an ssDNA erfolgt in einem stöchiometrischen Verhältnis von 3 Nukleotiden pro Monomer Recombinase. Dadurch entsteht ein helikaler Komplex aus RecA-Monomeren, welche die einzelsträngige DNA umhüllen. Es existieren zwei Formen des RecA-ssDNA-Filaments, die inaktive und die aktive Form. Das inaktive Filament wird bei der Abwesenheit des Cofaktors Nukleosidtriphosphate (NTP) gebildet. Durch die Bindung eines Nukleosidtriphosphates erhöht sich die Bindungsaffinität zwischen ssDNA und RecA und es entsteht das aktive Filament. Dieses Filament sucht sequenzspezifisch in der dsDNA nach der komplementären Sequenz und die RecA bindet mit der zweiten DNA-Bindungsstelle an dsDNA und katalysiert den Einzelstrangaustausch in der doppelsträngigen DNA (Abb. 4) [Cheng et al, 2008].

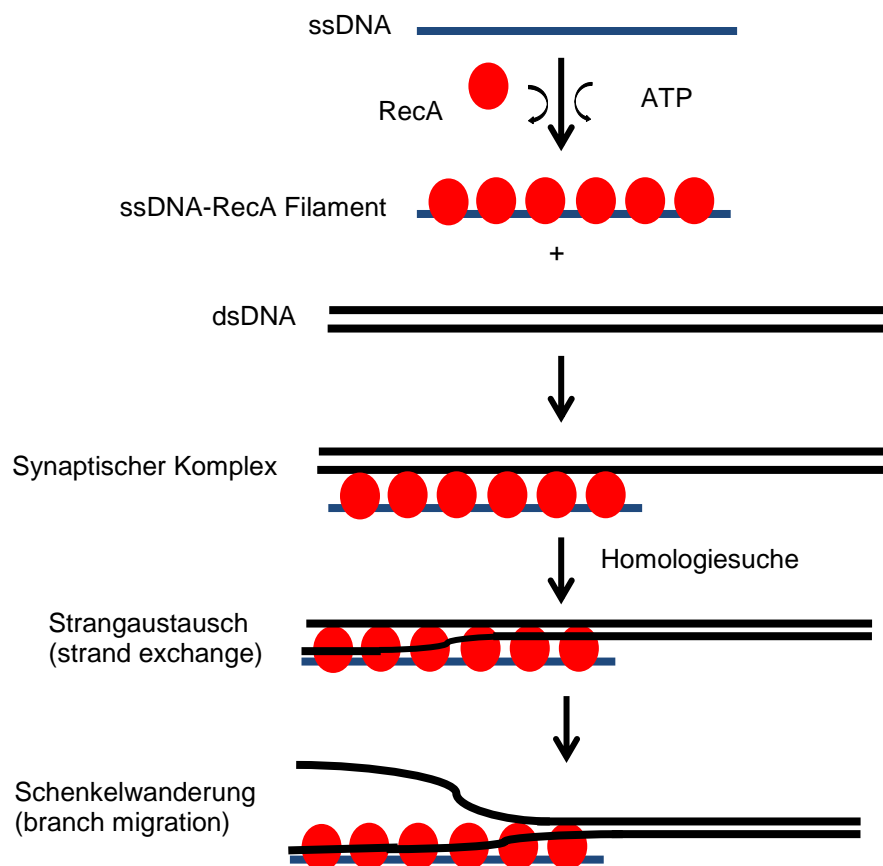


Abbildung 4 katalytische Aktivität der RecA

Die RecA bindet bei der Anwesenheit von ATP an die ssDNA und bildet ein Filament. Damit führt sie eine Homologiesuche auf der dsDNA durch und baut den komplementären Einzelstrang ein.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine isothermale Amplifikationstechnik zu finden, mit der ein schneller und gezielter DNA-Nachweis möglich ist und sich für den Einsatz in einem DNA-Teststreifensystem eignet. Der Test soll eine hohe Zuverlässigkeit bieten und positive Proben eindeutig identifizieren. Weiterhin soll die Methode sehr sensitiv sein, um auch geringste Mengen DNA nachweisen zu können. Untersuchungen der Reproduzierbarkeit sollen zeigen, ob die Methode zuverlässig pathogene Erreger identifizieren kann. Analysen über das Auftreten von falsch-positiven Resultaten sollen Aussagen über die Spezifität der Methode liefern. Weiter soll eine geeignete Detektionsmethode zum Nachweis der Amplifikation gefunden werden, die eine einfache und schnelle Auswertung der Resultate möglich macht. Die Technik soll zunächst beispielhaft für andere pathogene Erreger an dem *Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus* (MRSA) getestet werden. Weiter soll eine Methode getestet werden, mit der ein Einbau einer Sonde in einem amplifizierten Produkt möglich ist, ohne den Doppelstrang denaturieren zu müssen. Dazu soll das Enzym Recombinase A (RecA) genutzt werden. Die RecA soll eine markierte Oligonukleotidsonde durch Strangaustausch ins Innere einer doppelsträngigen DNA-Sequenz einbauen. Nur wenn in der Probe die genaue Basenabfolge der komplementären Sequenz vorhanden ist, soll die Sonde angelagert werden. Der Nachweis der eingebauten Sonde könnte somit die Spezifität der Amplifikationsmethode erhöhen. Dazu sollen verschiedene Versuche durchgeführt werden, um die Bindungskinetik der RecA zu analysieren.

3 Material

3.1 Chemikalien

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller (Stadt, Land)	Charge
(3-Aminopropyl)triethoxysilane	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)	BCBG0033V
Aceton (≥99,5 %)	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	135412365
Acrylamid-Lösung (40 %)-Mix 29:1	AppliChem GmbH (Darmstadt; D)	0J001986
Adenosin 5'-[Y-thio]triphosphate tetralithium salt (1 mM)	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)	071M1345BV
Agarose	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	122184392
Albumin	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	3737.1
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	160155480
Betain solution (5M)	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)	011M6020
Borsäure	AnalaR Normapur, BDH Prolabo, VWR International (Briare; F)	20185.360
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, D)	1.11746.0005
Calcein	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)	081M1799V
Carboxymethyldextran Chip CMD 500 I	XanTec bioanalytics GmbH (Düsseldorf, D)	SC CMD 500 I 1110.a
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	061163736
Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	500164797
Disuccinimidyl Suberate	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)	68528-80-3
Ethanol (>99,8 %)	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	481180107
Ethanolamin (1M, pH 8,5)	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)	STBB7800V
Ethidiumbromid-Lösung 1 %	AppliChem GmbH (Darmstadt; D)	91004429
Ethylendiamin-tetraessigsäure	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	24897161
EvaGreen®	Biotium Inc. (Hayward, USA)	10E1108
HEPES	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	281171374
Hydroxynaphthol blue	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)	SZBA2950V
Kaliumchlorid	J.T.Baker (Deventer; NL)	0435501013
Kalium-Di-Hydrogen-Phosphat	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	34788790

Name	Hersteller (Stadt, Land)	Charge
Magnesiumsulfat wasserfrei	Fluka, Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)	137310814308319
Mangan (II) chloride	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)	MKBF3612V
Natriumacetat	Fluka, Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)	123553561706031
Natriumchlorid	Chemsolution, Th.Geyer (Renningen; D)	1035/01/11
Natriumhydroxid	AppliChem GmbH (Darmstadt; D)	9U000723
N-Hydroxysuccinimid	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)	BCBB3130
Salzsäure	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	509150139
SDS/Natriumlaurylsulfat	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	230158783
Streptavidin aus Streptomyces avidinii (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)	081M8643BV
TEMED	Carl Roth GmbH Co KG (Karlsruhe; D)	03663897
Trizma®base	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)	SLBB2113V
Xylene cyanol FF	Merck (Darmstadt, D)	1.10590.0005

3.2 Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis; USA) hergestellt und im gefriergetrockneten Zustand geliefert. Die SATamra-Sonde wurde von der Firma Eurogentec GmbH (Seraing; Belgien) produziert. Dharmacon (Lafayette; Colorad) stellte die 2'-O-meRNA her. In Tabelle 2 sind alle verwendeten Oligonukleotidprimer aufgeführt. Die Sequenzabfolge ist vom 5' zum 3'-Ende dargestellt. Das G steht für Guanin, C für Cytosin, A für Adenin und T für Thymin. In der spezifischen Sonde SATamra steht das (S) für TAMRA, das (H) für THF und das (q1) für dTBHQ1. Das Oligonukleotid MRSA-Annealing ist eine 2'-O-Methyl-RNA-Sequenz, bei der jeder 2'-OH-Rest der Ribose eine Methylgruppe (me) trägt.

Tabelle 2 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Länge	DNA/ RNA
Biotin MRSA RPA fwd	[Btñ]CAAGATATGAAGTGGTAAATGGT	23mer	DNA
Cy3 MRSA RPA rev	[Cy3]TTTACGACTTGTTGCATACCATC	23mer	DNA
Cy3 MRSA-Incoming	[Cy3]TTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATT C	30mer	DNA
mecA4 dn 5'	TATATTCTTCGTTACTCATGCCATAC	26mer	DNA
mecA4 up	AAGCGACTTCACATCTATTAGGTTAT	26mer	DNA

Name	Sequenz (5' → 3')	Länge	DNA/ RNA
mecA-B3	AGGTTCTTTTTTATCTTCGGTTA	23mer	DNA
mecA-BIP	CCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACCTTCGT TACTCATGCCATAC	45mer	DNA
mecA-F3	AAGATGGCAAAGATATTCAACT	22mer	DNA
mecA-FIP	GTGGATAGCAGTACCTGAGCCTTGATGCTAA AGTTCAAAAGAGT	44mer	DNA
mecA-LB	TGTAAGCACACCTTCATATGACGT	24mer	DNA
mecA-LF	TAATCATTTTTTCATGTTG	18mer	DNA
MRSA-Incoming	TTTAGATAATGAAATATTATTAGCTGATTC	30mer	DNA
MRSA RPA fwd	CAAGATATGAAGTGGTAAATGGT	23mer	DNA
MRSA RPA rev	TTTACGACTTGTTGCATACCATC	23mer	DNA
MRSA-Annealing	meC.meA.meG.meC.meU.meA.meA.meU.meA. meA.meU.meA.meU.meU.meU.meC.meA	17mer	RNA
MRSA-Ligase	AGGTTACGGACAACGGTGAAATACTGATTAA C	32mer	DNA
orfX	CCCAAGGGCAAAGCGACTTTGTATTCGTCAT TGGCGGATCAAACG	45mer	DNA
SATamra1	TGTTAATTGAACAAGTGTACAGAGCATT(S)A(H)GA(q1)TATGCGGGAG	41mer	DNA
sccl/II	CTCAAAGCTAGAACTTTGCTTCACTATAAGT ATTC	35mer	DNA
scclII	CCAATATTTTCATATATGTAATTCCTCCACATC TCA	35mer	DNA

3.3 Molekularbiologische Reagenzien

Die verwendete MRSA-gDNA wurde von Mitarbeitern des Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie isoliert und aufgereinigt. Alle weiteren Reagenzien sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 Molekularbiologische Reagenzien

Name	Hersteller (Stadt, Land)	Charge
Bst Polymerase	New England Biolabs (Ipswich; UK)	0501110
Bst Polymerase Reaktionspuffer	New England Biolabs (Ipswich; UK)	0021107
dNTPs (10 mM)	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen; D)	080211
GenRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham; USA)	00099877
Proteinase K	Qiagen (Hilden, D)	51304
RecA (2 mg/ml)	New England Biolabs (Ipswich; UK)	0211110
RecA Reaktionspuffer (10x)	New England Biolabs (Ipswich; UK)	0021102
Taq DNA Polymerase (5 u/μl)	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen; D)	091411-5
Taq Polymerase Puffer Y (10x)	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen; D)	1114111

3.4 Verwendete Puffer

- 10x TBE-Puffer
1 M Tris; 0.9 M Borsäure; 0.01 M EDTA
- 1 M Tris-HCl Puffer (pH 7,5)
1 M Tris; 0.249 M HCl
- PBS-Puffer
10 mM Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat-Dihydrat; 140 mM NaCl; 2.7 mM KCl;
1.8 mM Kalium-Di-Hydrogen-Phosphat
- Laufpuffer
10 mM HEPES; 0.15 M NaCl; 3 mM EDTA; 0,005 % (v/v) Tween, pH 7,4; steril
filtriert; entgast
- 6x Ladepuffer
10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 0.03 % Bromophenolblau; 0.03 % Xylene cyanol FF;
60 mM EDTA

3.5 Kommerzielle Testkits

- Nucleospin® Gel and PCR Clean-up; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren; D)
- TwistAmp nfo-Kit; TwistDX (Cambridge; UK)
- TwistAmp™ Basic-Kit; TwistDX (Cambridge; UK)

3.6 Geräte

- Thermocycler: TProfessional 96; Biometra GmbH (Göttingen, D)
- Transilluminator: Geldoku Agarosegele/Transilluminator Gel Jet mit gelcam High, 312 nm; INTAS Science Imaging Instruments GmbH (Göttinge, D)
- Stromgerät für Elektrophorese: Power Supply Consort EV202; Consort bvba (Turnhout, B)
- Lightcycler: Real-Time PCR 480; Roche Diagnostics (Mannheim, D)
- Biacore: Biacore X 100 SPR; GE Healthcare (Uppsala; S)
- UV/Vis-Spektralphotometer: NanoDrop ND-1000 UV/Vis; PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen; D)
- Fluoreszenzscanner: Genepix Professional 4200A; Molecular Devices GmbH (Ismaning, DL)

4 Methoden

In diesem Kapitel werden die Testmethoden beschrieben, mit denen die isothermalen Amplifikationsmethoden LAMP und RPA näher charakterisiert und hinsichtlich der Anwendung auf einem Teststreifensystem analysiert werden können. Des Weiteren werden die Techniken erläutert, mit denen die Bindungskinetik der RecA aufgezeigt werden soll.

4.1 PCR

4.1.1 Referenz-PCR

Die PCR ist die Standardmethode zur Amplifikation von DNA. Um die Sensitivität der verschiedenen isothermalen Amplifikationsmethoden analysieren zu können, wurde eine Referenz-PCR durchgeführt. Dazu wurden mecA4-Primer verwendet, dessen Zielsequenz sich im mecA-Gen des *Methicillin resistenten Staphylococcus aureus* befindet. Dazu wurden 5 Ansätze hergestellt mit jeweils 2,5 µl mecA4 up und dn, 5 µl Reactionbuffer Y (10x), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase und 38,5 µl ddH₂O. Zu den Proben wurde eine absteigende Konzentration an MRSA-gDNA von 0,1 ng/µl bis 0,00001 ng/µl zugegeben. Die Inkubationsbedingungen sind nachfolgend dargestellt.

Tabelle 4 Inkubationsbedingung der PCR

Segment	Temp (°C)	Zeit	} 40 Zyklen
Initial Denaturierung	95	10 min	
Denaturierung	95	3 sec	
Annealing	58	5 sec	
Elongation	72	20 sec	
Finale Elongation	72	10 min	

Das Ergebnis wurde mittels Elektrophorese auf einem 1,5 %igen Agarosegel sichtbar gemacht.

4.1.2 Herstellung amplifizierter Produkte

Für nachfolgende Tests wurden unterschiedlich markierte PCR-Produkte benötigt. Zur Amplifikation vom unmarkierten Produkt wurde der MRSA RPA rev und fwd Primer eingesetzt. Der Biotin-MRSA RPA fwd Primer wurde eingesetzt, um das Produkt mit Biotin zu markieren und zur Kennzeichnung des Produktes mit einem Fluoreszenzmarker wurde

der Cy3-MRSA RPA rev zur Amplifikation eingesetzt. Die Ansätze enthielten jeweils 2,5 µl forward und reverse Primer, 5 µl Reactionbuffer Y (10x), 1 µl MRSA-gDNA (5 ng/µl), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase und 38,5 µl ddH₂O. Die Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 4 dargestellt. Danach wurden die Proben auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Produktbanden unter einem Transilluminator sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelaufreinigung der DNA erfolgte mit dem Nucleospin® Gel and PCR Clean-up nach Anleitung. Die Konzentrationsbestimmung der enthaltenen DNA erfolgte am NanoDrop.

4.2 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Im nachfolgenden Kapitel sind verschiedene Tests beschrieben, um die isothermale Amplifikationsmethode LAMP zu charakterisieren. Die verwendeten Primer stammen aus [Misawa et al, 2007]. Ein Reaktionsansatz der LAMP bestand üblicherweise aus folgenden Komponenten:

- 4 µl mecA-FIP (10 µM),
- 4 µl mecA-BIP (10 µM)
- 0,5 µl mecA-F3 (10 µM) und
- 0,5 µl mecA-B3 (10 µM)
- 4 µl dNTPs (10 µM)
- 0,5 µl MgSO₄ (280 mM),
- 5 µl Betain (5 mM),
- 2,5 µl Thermopolpuffer (10X),
- 1 µl MRSA-gDNA
- 2 µl Bst Polymerase (8.000 U/ml)

Die Proben wurden 90 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 80 °C terminiert.

4.2.1 Visualisierung der LAMP mit Calcein

Damit die LAMP auf einem Teststreifensystem zur Anwendung kommen kann, müssen geeignete Detektionsmethoden gefunden werden, die positive Proben zuverlässig anzeigen. Dazu wurde die Visualisierungsmethode mit dem fluoreszierende Metallindikator Calcein getestet, welches zusammen mit Manganionen in den Ansatz gegeben wurde. Mangan wirkt als Quencher und löscht die Fluoreszenz des Calcein. Bei der Amplifikationsreaktion entsteht durch den Einbau der dNTPs als Nebenprodukt Pyrophosphat. Dieses entzieht dem Calcein die Manganionen, wodurch die Emission von Fluoreszenzlicht hervorgerufen wird [Tomita et al, 2008]. Für die Durchführung wurde

zusätzlich zu den unter Punkt 4.2. beschriebenen Komponenten noch 0,5 µl Calcein (2,5 mM) und 0,5 µl MnCl₂ (50 mM) hinzugefügt. Die Proben wurden 90 Minuten bei 65 °C inkubiert. Die Ergebnisse wurden anschließend mit Hilfe eines Transilluminators sichtbar gemacht.

4.2.2 Visualisierung der LAMP mit HNB

Eine weitere Detektionsmethode, welche eine Auswertung mit bloßen Augen möglich machte, war die Zugabe von Hydroxynaphtholblau (HNB). HNB ist ein Metallindikator, der die sinkende Magnesiumkonzentration während der Amplifikation anzeigt [Ma et al, 2007]. Das bei dem Einbau der dNTPs frei werdende Pyrophosphat bildet mit den Magnesium Ionen eine schwer lösliche Verbindung. Dadurch sinkt die Konzentration an freien Magnesiumionen, welches zu einem Farbumschlag des HNB von lila zu blau führt [Goto, 2009]. Für die Durchführung wurden neben den Komponenten unter Punkt 4.2 noch 1,5 µl HNB (2 mM) in den LAMP-Ansatz gegeben. Das Ergebnis wurde ohne weitere Hilfsmittel direkt abgelesen.

4.2.3 Optimierung der LAMP durch zwei weitere Primer

Um die Sensitivität der Loop-mediated isothermal Amplification zu verbessern, wurde der Einsatz von zwei zusätzlichen Primern (Loop-Primer) getestet [Xua et al, 2011]. Um eine Aussage über die Reaktionszeit und die Menge an amplifiziertem Produkt zu erhalten, wurde die Amplifikation am Lightcycler in Echtzeit verfolgt. Dazu wurden zwei Testreihen, einmal mit vier und einmal mit sechs Primern, angesetzt. Um die Sensitivität der Methode zu überprüfen, wurden von beiden Testreihen vier Proben mit 0,1 ng/µl, 0,3 ng/µl, 0,4 ng/µl und 0,6 ng/µl DNA angesetzt. Die Ansätze enthielten die unter Punkt 4.2 beschriebenen Komponenten. Bei der Testreihe mit den sechs Primern wurde zusätzlich 2 µl mecA-LF (10 µM) und 2 µl mecA-LB (10 µM) hinzugefügt. Zu allen Ansätzen wurde 0,5 µl Calcein (2,5 mM) und 0,5 µl MnCl₂ (50 mM) pipettiert. Die Proben wurden in einer 96-well-Platte angesetzt und der Anstieg der Fluoreszenz des Calcein wurde am Lightcycler gemessen.

4.3 Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

Zur Analyse der isothermalen Amplifikationsmethode RPA wurden verschiedenen Tests angesetzt. Die RPA wurde mittels TwistAmp™ Basic-Kit von der Firma TwistDX durchgeführt. Zu dem lyophilisierten Reagenz wurden die in Tabelle 5 ersichtlichen Bestandteile dazugegeben. Die Inkubationsbedingungen sind ebenfalls in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5 Bestandteile eines RPA-Ansatzes

Rehydrationslösung (TwistAmp™)	Rehydrations- lösung [µl]
MRSA RPA fwd (10 µM)	2,4
MRSA RPA rev (10 µM)	2,4
Rehydrationspuffer	29,5
MRSA gDNA (5 ng/µl)	0,5
ddH ₂ O	12,7
Gesamtvolumen (Rehydrationslösung)	47,5

'Magnesium start' (TwistAmp™) [µl]	
Magnesium Acetate (280 mM)	2,5
Gesamtvolumen	50

Inkubationszeit	30 Minuten
Inkubationstemperatur	37 °C

4.3.1 Denaturierung störender Proteine

Vorhergehende Versuche haben gezeigt, dass der Ansatz nach der Amplifikation für die Gelelektrophorese aufgereinigt werden muss, da ansonsten keine klaren Banden erkennbar sind. Es entsteht ein DNA-Shift, da im Ansatz enthaltene Proteine an die DNA gebunden sind, die eine Verzögerung der elektrophoretischen Mobilität der DNA bewirken. Um diese nach der Amplifikation aus der Probe zu entfernen, wurden DNA-Aufreinigungskits verwendet. Diese Methode ist sehr aufwendig und birgt eine große Kontaminationsgefahr, da das amplifizierte Produkt mehrmals pipettiert werden muss. Um dieses Risiko zu umgehen wurden andere Denaturierungsverfahren getestet, die weniger aufwendig sind und ein zuverlässigeres Ergebnis liefern. Dazu wurden 10 Reaktionsansätze mit jeweils 2,4 µl MRSA-RPA-Primer fwd (10 µM), 2,4 µl MRSA-RPA-Primer rev (10 µM), 29,5 µl Reaktionspuffer, 1 µl MRSA gDNA (5 ng/µl) und 47,5 µl ddH₂O zusammen pipettiert und zu dem lyophilisierten Reagenz des TwistAmp™ Basic-Kit gegeben. Um die Reaktion zu starten, wurden 2,5 µl Magnesiumacetat (280 mM) dazugegeben. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben wie in Tabelle 6 zu sehen behandelt.

Tabelle 6 Probenaufbereitung der unterschiedlichen Denaturierungsverfahren

Probe	Denaturierungsverfahren
1	Unbehandelt
2	10 Minuten bei 95 °C inkubiert
3	20 Minuten bei 95 °C inkubiert
4	0,5 µl Proteinase K, 10 Minuten bei 50 °C inkubiert
5	0,25 µl Proteinase K, 10 Minuten bei 50 °C inkubiert
6	0,1 µl Proteinase K, 10 Minuten bei 50 °C inkubiert
7	1 µl HCl (1 M), 10 Minuten bei RT inkubiert
8	2,5 µl HCl (1 M), 10 Minuten bei RT inkubiert
9	5 µl HCl (1 M), 10 Minuten bei RT inkubiert
10	1 µl NaOH (1 M), 10 Minuten bei RT inkubiert
11	2,5 µl NaOH (1 M), 10 Minuten bei RT inkubiert
12	5 µl NaOH (1 M), 10 Minuten bei RT inkubiert

Danach wurden die Proben auf ein 1,5 %iges Agarose-Ethidiumbromidgel aufgetragen. Die Elektrophoretische Auftrennung erfolgte 35 Minuten bei 150 V, 250 mA und 35 W. Die DNA wurde bei einer Wellenlänge von 312 nm unter einem Transilluminator sichtbar gemacht.

4.3.2 Nachweisgrenze

Ein wichtiges Qualitätskriterium einer Amplifikationsmethode ist die Sensitivität. Ziel ist eine Detektion möglichst geringer DNA-Konzentrationen. Zur Testung der Sensitivität der RPA wurden fünf Ansätze mit absteigenden gDNA-Konzentrationen hergestellt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7 Reaktionsansätze der RPA zur Bestimmung der Nachweisgrenze

Rehydrationslösung (TwistAmp™)	1	2	3	4	5	6
MRSA RPA fwd (10 µM)	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
MRSA RPA rev (10 µM)	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
Rehydrationspuffer	29,5	29,5	29,5	29,5	29,5	29,5
MRSA gDNA (5 ng/µl)		1				
MRSA gDNA (0,5 ng/µl)			1			
MRSA gDNA (0,05 ng/µl)				1		
MRSA gDNA (0,005 ng/µl)					1	
MRSA gDNA (0,0005 ng/µl)						1
ddH ₂ O	13,2	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2
Gesamtvolumen (Rehydrationslösung)	47,5	47,5	47,5	47,5	47,5	47,5
Lyophilisiertes Reagenz	1x	1x	1x	1x	1x	1x

Um die Reaktion zu starten wurden zu den Ansätzen 2,5 µl Magnesium Acetate (280 mM) hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37 °C. Nach der Amplifikation wurde zu den Ansätzen 0,5 ml Proteinase K pipettiert und 10 Minuten bei 50 °C störende Proteine denaturiert. Die Detektion der DNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte 35 Minuten bei 150 V, 250 mA und 35 W. Die DNA wurde bei einer Wellenlänge von 312 nm unter einem Transilluminator sichtbar gemacht.

4.3.3 Temperaturgradient

Für die Anwendung einer isothermale Amplifikationsmethode in einem Teststreifensystem war es relevant zu bestimmen, bei welcher minimalen Inkubationstemperatur die Recombinase Polymerase Amplifikation noch Produkt amplifiziert. Dazu wurden fünf Ansätze hergestellt, entsprechend Tabelle 5, die bei abweichenden Temperaturen inkubiert wurden. Die erste Probe wurde bei einer optimalen Reaktionstemperatur von 37 °C inkubiert, Probe zwei bei 34 °C, drei bei 30 °C, vier bei 27 °C und die letzte Probe bei 24 °C. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Die Entfernung der Proteine erfolgte nach der Amplifikation durch Zugabe von 0,5 µl Proteinase K. Im Anschluss wurde eine Elektrophorese durchgeführt.

4.3.4 Reaktionszeit

Eine Analyse über die Inkubationszeit soll zeigen, in welcher Zeitspanne RPA-Produkt amplifiziert wird. Dazu wurden sieben RPA-Ansätze, wie in Tabelle 5 beschrieben, hergestellt. Diese wurden für 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit Proteinase K behandelt und auf ein Agarosegel aufgetragen.

4.3.5 SATamra-Sonde

Um eine höhere Spezifität der RPA-Methode zu erreichen, wurde die Verwendung einer Sonde getestet. Der Aufbau dieser SATamra-Sonde ist in Abbildung 5 dargestellt. Sie bestand aus 44 Basenpaaren und wurde mit dem Quencher-Farbstoff Tamra und dem Quencher BHQ1 markiert. Außerdem wurde zwischen dem Farbstoff und dem Quencher ein Tetrahydrofuran-Rest eingebaut. Ein Block am 3'-Ende verhinderte, dass das Oligonukleotid auch als Amplifikationsprimer diente. In dem für diese Methode angewandten Nfo-Kit von TwistDX ist die Endonuklease Nfo enthalten. Wenn sich die Sonde während der Reaktion an die spezifische Sequenz anlagern konnte, spaltete das Enzym Nfo am THF-Rest und die Polymerase entfernte den Quencher durch ihre

Strangverdrängungsaktivität. Dadurch kam es zur räumlichen Trennung vom Fluoreszenzfarbstoff Tamra und Quencher BHQ, was zu einem messbaren Anstieg der Fluoreszenz führte. Die Spaltungsreaktion erzeugte außerdem ein freies 3'-OH-Ende am 5'-Rest der durchtrennten Sonde. Dieses Oligomer konnte danach durch die Polymerase verlängert werden und diente somit als Amplifikationsprimer. Da die Nukleasereaktion nur stattfinden kann, wenn sich die Sonde an der spezifischen Sequenz anlagert, war der Anstieg der Fluoreszenz ein spezifischer Indikator für die Anwesenheit der Zielsequenz. [Piepenburg et al; 2006s]

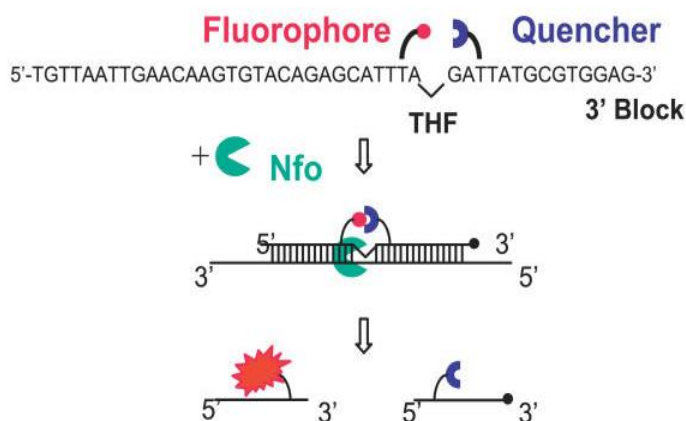


Abbildung 5 Aufbau und Detektionsprinzip der SATamra-Sonde [Piepenburg et al, 2006]

Die SATamra-Sonde ist mit dem Quencher-Farbstoff Tamra und dem Quencher BHQ1 markiert. Dazwischen befindet sich ein Tetrahydrofuran-Rest. Wenn die Sonde an einem komplementären Strang bindet, kann das Enzym Nfo die Sonde an dem THF-Rest auseinander spalten. Die Polymerase entfernt den Teil der Sonde an dem der Quencher gebunden ist und die Fluoreszenzlösung wird aufgehoben.

Für die Durchführung der Sonden-RPA wurden die Primer aus der Publikation [Piepenburg, et al, 2006] benutzt, in der die Verwendung von zwei verschiedenen forward-Primern und einem revers Primer beschrieben wurde. Drei polymorphe Allele der SCC mec Region (staphylococcal cassette chromosome mec) repräsentieren die große Mehrheit der bekannten MRSA-Genotypen (MRSAI bis III). Während sie den genomischen Locus orfX teilen, unterscheiden sie sich in der Reihenfolge des SCC mec. Die integrierten Elemente von MRSAI und II sind homolog zueinander, mit Ausnahme eines 102-Basenpaar-Insertion / Deletion, während die MRSAIII SCC mec stark voneinander abweicht. Somit werden zwei spezifische Primer benötigt, einer zur Detektion von MRSAI/II und einer für den MRSAIII-Genotyp. Des Weiteren wurde ein reverse Primer, der an dem von beiden geteilten Bereich orfX bindet, eingesetzt. Die verwendete Sonde SATamra1 wurde so designt, dass sie an einem gemeinsamen Bereich bindet [Piepenburg et al, 2006].

Für den Ansatz wurden 2,5 µl Primer forward (10 µM) und 0,5 µl Primer reverse (10 µM), 0,3 µl SATamra I (10 µM), 1 µl MRSA gDNA (5 ng/µl), 12,2 µl H₂O und 29,5 µl Nfo Rehydrationspuffer zusammen pipettiert. Diese Rehydrationslösung wurde zu lyophilisierten Reagenz aus dem TwistAmp Nfo-Kit gegeben und in 96-well Platten überführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2,5 µl Magnesiumacetat (280 mM) gestartet. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde in Echtzeit am Lightcycler bei einer Wellenlänge von 533/580 nm gemessen.

4.3.6 Lagerungsstabilität

Der Hersteller des TwistAmp™ Kits empfiehlt für die Lagerung der lyophilisierten Reagenzien eine Temperatur von -20 °C. Um zu testen, ob die Reagenzien auch bei höheren Temperaturen gelagert werden können, ohne dass dies zu einem Verlust der Funktionalität führt, wurde das Lyophilisat bei einer Temperatur von 4 °C (Kühlschranktemperatur) und 24 °C (Raumtemperatur) für vier und acht Wochen gelagert. Nach Ablauf der Lagerungszeit wurde mit den Reagenzien eine RPA, entsprechend Tabelle 5, durchgeführt. Zum Vergleich wurde jeweils ein Referenzansatz mit Lyophilisat, das bei -20 °C gelagert wurde, mitgeführt.

4.4 RecA

In diesem die der Arbeit sollte durch unterschiedliche Verfahren gezeigt werden, ob die RecA genutzt werden kann, um eine Oligonukleotidsonde sequenzspezifisch in ein amplifiziertes Produkt einzubauen. Dadurch könnte eine Sonde an einem amplifizierten Produkt hybridisiert werden, ohne dass die DNA vorab denaturiert werden muss. Diese Reaktion nutzt die Aktivität des RecA-Proteins, das an einzelsträngiger DNA sequenzunabhängig polymerisiert und ein Nukleoprotein-Filament formt, welches in der Lage ist, in Duplex-DNA einzudringen (Abb. 6). Das RecA-beschichtete Nukleoprotein-Filament scannt die dsDNA nach einer homologen Sequenz ab, vermittelt den Strang austausch und die Rekombination zwischen dem eingeführten DNA-Strang und dem Doppelstrang [Cunningham et al. 1979]. Herkömmliche Hybridisierungsmethoden beruhen auf dem Vorhandensein von Einzelstrang-DNA durch vorherige Denaturierung. Da die RecA in der Lage ist, mit einzelsträngiger DNA ein Filament zu bilden und mit diesem eine Homologiesuche auf einem Doppelstrang durchführt, wäre das Binden der Sonde ein zuverlässiger Indikator für das Vorhandensein der Template-DNA und könnte bei einer Reaktionstemperatur der RecA von 37 °C durchgeführt werden [Rigas et al., 1986].

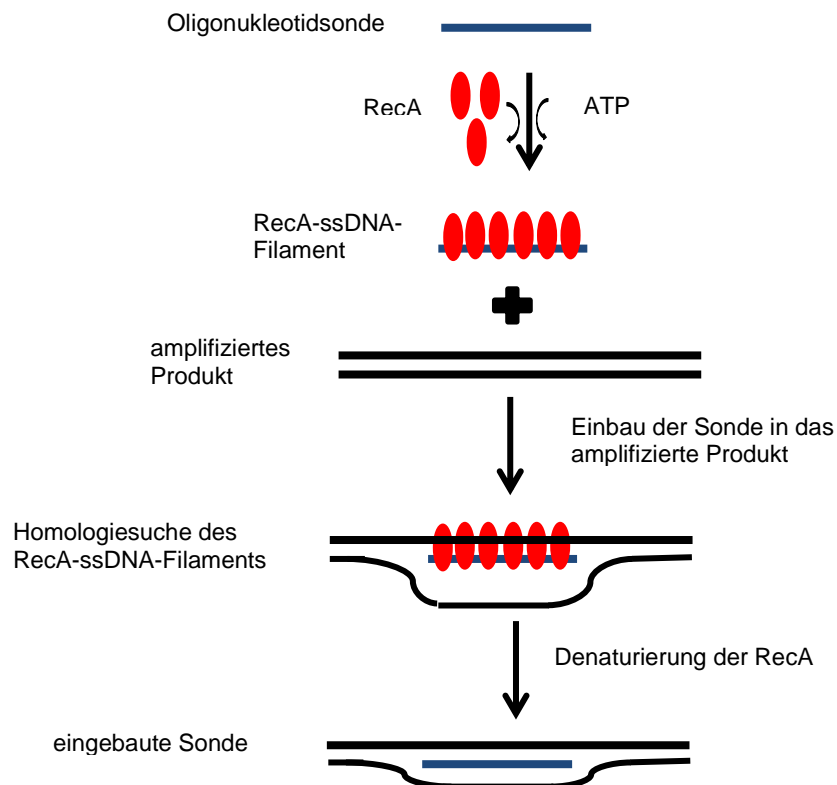


Abbildung 6 Prinzip der Sondenhybridisierung durch die RecA

Die RecA bindet an die Oligonukleotidsonde unter Ausbildung eines Filaments. Dieser Komplex führt auf der Template-DNA eine Homologiesuche durch. Bei vorhandener Homologie wird die Sonde in die dsDNA eingebaut.

Somit könnte die Spezifität des Testsystems erhöht werden, denn die Sonde bindet nur innerhalb des amplifizierten PCR-Produkts und somit kann ausgeschlossen werden, dass unspezifische Produkte oder Primer-Dimer ein Signal hervorrufen. Durch eine Markierung der Sonde mit z.B. Goldpartikeln könnte der Einbau auch auf einem Teststreifensystem nachgewiesen werden. Die nachfolgenden Methoden dienen der Charakterisierung der Bindungskinetik der RecA an dsDNA und ssDNA, um Aussagen über die Anwendbarkeit dieses Konzepts zu erhalten.

4.4.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der elektrophoretische Mobilitätstest ist eine schnelle und empfindliche Methode, um Protein-Nukleinsäure-Interaktionen zu erkennen. Das Grundprinzip beruht auf der herabgesetzten elektrophoretischen Mobilität des Protein-Nukleinsäure-Komplexes im Vergleich zur freien Nukleinsäure. Grund für diesen Effekt ist zum einen der Siebeffekt der

Gelmatrix, der die Wanderung beeinflusst. Die Mobilität ist generell umgekehrt proportional zu seinem Molekulargewicht. Durch die Bindung eines Proteins erhöht sich das Molekulargewicht und die DNA wandert langsamer durch das Gel. Weiter kann es durch die Bindung zu einer Konformationsänderung der DNA kommen, wodurch auch die Mobilität der DNA durch das Gel beeinflusst wird. Einfluss auf das Wanderverhalten der DNA hat auch die Ladung des gebundenen Proteins. Ein positiv geladenes Protein bewirkt bei der Bindung an die negativ geladene DNA eine geringere Mobilität, wohingegen ein negatives Protein zu einem geringeren Shift führt [Hellman et al, 2007].

Bindungsnachweis an dsDNA

Für die Durchführung des Electrophoretic Mobility Shift Assay zum Nachweis der Bindung an dsDNA wurden 1 µl RecA (2 mg/ml), 12 µl ATPγS und amplifiziertes PCR Produkt (Punkt 4.1.2) inkubiert, damit sich eine Bindung zwischen Enzym und DNA ausbilden konnte. Die Inkubation erfolgte zum einen in RecA-Reaktionspuffer und zum anderen in ddH₂O. Zur Detektion der Bindung wurde die Probe auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit dem DNA-Farbstoff Ethidiumbromid gefärbt, um die DNA sichtbar zu machen.

Bindungsnachweis an ssDNA

Zum Nachweis der Bindung an ssDNA wurden drei Ansätze hergestellt, die 1 µl RecA (2 mg/ml), 12 µl ATPγS und 2,5 µl MRSA- Incoming Oligonukleotid enthielten. Probe eins wurde in RecA-Reaktionspuffer inkubiert, Probe zwei in HEPES-Puffer und Probe drei in ddH₂O. Als Negativkontrolle wurde jeweils eine Probe ohne RecA mitgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Danach wurde die Probe auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen, da dieses eine besser elektrophoretische Auflösung für kleinere DNA-Protein-Komplexe bietet und darüber hinaus sind einige Komplexe deutlich stabiler in der Polyacrylamid-Matrizen als in Agarosegelen. Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wurden 4,5 ml Acrylamid-Lösung (40 %), 3 ml TBE (5x), 7,35 ml ddH₂O, 150 µl Ammoniumperoxodisulfat (10 %) und 15 µl TEMED zusammen pipettiert und in eine Mini-PROTEAN® Tetra Cell Kammer (BioRad) überführt. Nach der Polymerisation wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte 90 Minuten bei 70 V. Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt.

4.4.2 Nachweis markierter Oligonukleotide auf silanisierten und Streptavidin-beschichteten Objektträgern

Diese Methode dient dem Bindungsnachweis einer markierten Oligonukleotidsonde an ein amplifiziertes PCR-Produkt, welches am 5'-Ende mit Biotin markiert ist. Dazu wurden die Objektträger silanisiert, wodurch Amino-propyltrimethoxysilan kovalent an die Glasoberfläche gebunden wurde (Abb. 7a). An den so entstandenen freien Aminogruppen wurde der Crosslinker Disuccinimidyl suberate (DSS) gebunden und die Oberfläche aktiviert (Abb. 7b). An die so aktivierte Oberfläche band das Protein Streptavidin über dessen freie Aminogruppe (Abb. 7c). Streptavidin ist ein vom Bakterium *Streptomyces avidinii* produziertes Protein, welches eine sehr hohe Affinität zu Biotin aufweist. Die Streptavidin-Biotin-Bindung ist eine der stärksten bekannten nichtkovalenten Bindungen zwischen einem Protein und einem Liganden. Die Bindungsreaktion ist schnell und wenn sie sich einmal ausgebildet hat, ist sie weitgehend unabhängig von extremen pH-Werten, Temperaturen, organischen Lösungsmitteln und anderen Denaturierungsmitteln. Die Detektion eines über Biotin gebundenen Produktes erfolgt über eine weitere Markierung. Dies kann ein Antikörper, ein enzymatisches Produkt oder ein Fluoreszenzfarbstoff sein. Somit wird nur DNA detektiert, die mit Biotin und einem weiteren Marker markiert ist [Brandt, 2004].

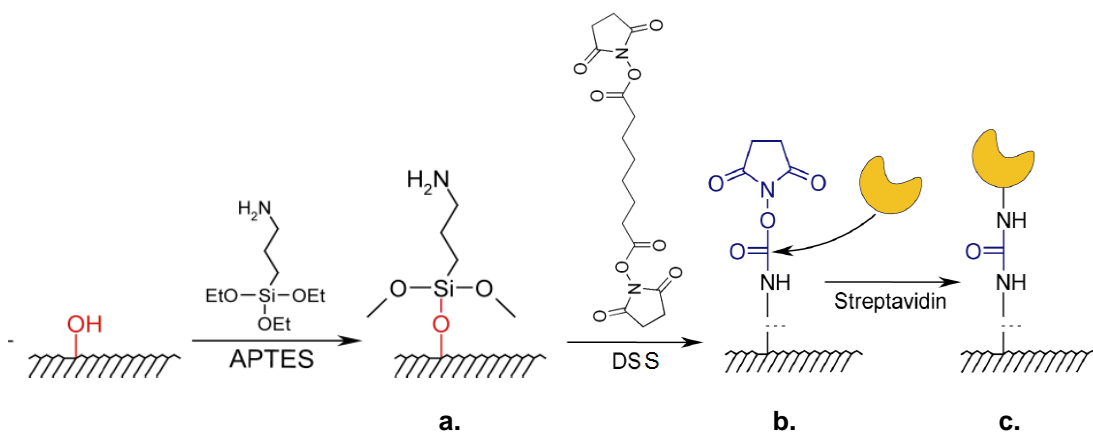


Abbildung 7 Schema der Streptavidinbeschichtung von Objektträgern [Brandt et al, 2003]

Das Bild zeigt die Silanisierung von Glasoberflächen mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan (a.), die Aktivierung der silanisierten Oberfläche mit DSS (b.) und die anschließende Beschichtung mit Streptavidin (c.).

Die Silanisierung der Objektträger wurde erreicht, indem die OTs für eine Stunde in einer 8 M NaOH-Lösung aktiviert wurden. Danach wurden die OT mit 70 %igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurden sie für eine weitere Stunde in einer Lösung mit Aceton und 5 % ATPES inkubiert. Danach wurden sie mit Aceton gewaschen

und für eine Stunde bei 120 °C in den Ofen gestellt. Nach der Silanisierung erfolgte die Aktivierung der Oberfläche mit einer Lösung aus DSS und DMSO. Dazu wurden drei tropfengroße Bereiche auf einem OT markiert, die Lösung aufpipettiert und 30 Minuten inkubiert. Nachdem die OTs mit 1 M Tris-HCl Puffer (pH 7,5) gespült wurden, erfolgte die Beschichtung mit Streptavidin (7,5 mg/μl) in den markierten Bereichen. Danach wurde die überschüssige Lösung mit 1 M Tris HCl Puffer (pH 7,5) abgespült. Der gesamte OT wurde anschließend mit 5 % BSA/PBS Puffer geblockt, um unspezifische Bindungen an den Objektträger zu vermeiden.

Nachweis von Biotin- und Cy3- markiertem PCR-Produkt

Mit diesem Test soll gezeigt werden, ob ein PCR-Produkt, welches mit Biotin- und Cy3 markiert wurde, an die Oberfläche des Streptavidin-beschichteten OT bindet (Abb. 8). Die Negativkontrolle, die ein Cy3-markiertes Oligonukleotid und ein Biotin-markiertes Oligonukleotid enthielt, soll möglichst kein Fluoreszenzsignal zeigen. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die Cy3-markierten Oligonukleotide nicht unspezifisch an die beschichtete Glasoberfläche binden oder mit den Biotin-markierten Oligonukleotiden Dimere bilden.

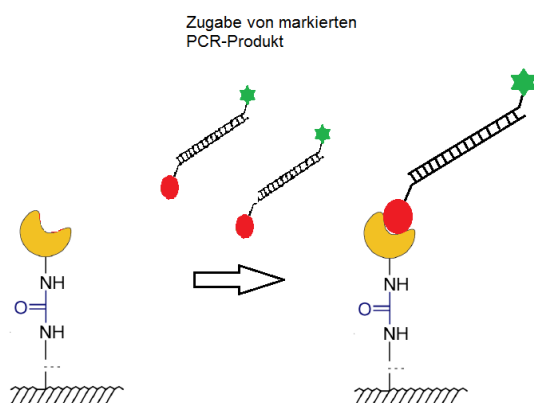


Abbildung 8 Bindung eines markierten PCR-Produkts an einem streptavidin-beschichteten Objektträger

Schematische Darstellung der Bindung eines PCR-Produktes, welches mit Biotin (rot) und Cy3 (grün) markiert wurde, an einem streptavidin-beschichteten Objektträger.

Zur Durchführung des Versuches wurde ein unter Punkt 4.1.2 amplifiziertes und aus dem Gel aufgereinigtes PCR-Produkt auf den markierten Bereich eines silanisierten und mit streptavidin-beschichteten Objektträgers gegeben und 20 Minuten inkubiert. Um nicht gebundene Bestandteile zu entfernen wurde der Objektträger mit ddH₂O gespült. Als Negativkontrolle wurde eine Mischung aus CY3-markierten Oligonukleotiden und Biotin-markierten Oligonukleotiden mitgeführt. Nach der Trocknung des Objektträgers, wurde

das resultierende Fluoreszenzsignal unter dem Genepix-Scanner bei einer Wellenlänge von 532 nm ausgewertet.

Nachweis des Einbaus einer Fluoreszenzsonde durch die RecA

Bei diesem Versuch soll gezeigt werden, ob die RecA eine fluoreszenz-markierte Sonde in ein PCR-Produkt einbaut. Dieses Produkt wurde Biotin-markiert und ist somit in der Lage an die streptavidin-beschichteten OT zu binden. Wenn ein Einbau stattgefunden hat, bindet das Produkt an Streptavidin und die eingebaute Fluoreszenzsonde ruft ein Signal hervor. Wenn die Sonde nicht eingebaut wurde, kann das Produkt ebenfalls binden, jedoch kann kein Fluoreszenzsignal gemessen werden, denn die ungebundenen Bestandteile werden nach der Inkubation mit Wasser weggespült. Für diesen Versuch wurde eine Fluoreszenzsonde designt, die in dem unter Punkt 4.1.2 amplifizierte Produkte bindet. Um die genaue Sequenzabfolge des Produktes zu charakterisieren, wurde das Produkt von der Firma SEQLAB (Göttingen; D) sequenziert. Die Sonde (MRSA-Incoming) wurde anschließend mit Hilfe des Programmes Primer3 (v.0.4.0) entworfen. Für die Durchführung des Tests wurde die Cy3 MRSA-Incoming Sonde zusammen mit RecA und ATP γ S 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde Biotin-markiertes PCR-Produkt dazugegeben und weitere 30 Minuten inkubiert. Der Ansatz wurde auf einen Streptavidin-beschichteten Objektträger gegeben und konnte 20 Minuten einwirken. Nicht gebundene Produkte wurden mit ddH₂O weggespült. Als Negativkontrolle wurde eine Probe mit den analogen Komponenten aber ohne RecA mitgeführt.

Stabilisierung der ds/ssDNA-Triplehelix

[Rice et al, 2004] beschreibt in seiner Veröffentlichung "Fluorescent Detection and Isolation of DNA Variants Using Stabilized RecA-Coated Oligonucleotides" eine Methode zur Stabilisierung der durch die RecA entstandenen Triplehelix. Dabei dringt zuerst das RecA beschichtete Oligonukleotidfilament in die dsDNA ein und bildet einen synaptischen Zwischenzustand, der auch als D-loop bezeichnet wird. Als Ergebnis wird der verdrängte Strang verfügbar und ist in der Lage, Hybridisierung eines zweiten einzelsträngigen Nukleinsäure-Molekül zu einem viersträngigen gemeinsamen Molekül zu erstellen. Die Oligonukleotidsonde bindet somit an den verdrängten Strang des Komplexes und formt einen stabilen, sogenannten double D-loop (Abb. 9). Diese Verbindungsmoleküle sind resistent gegenüber Dissoziation, wenn beide Oligonukleotide vollständig komplementär zu der Ziel-Sequenz sind. Aber wenn die Sonden nicht übereinstimmen, ist der Komplex instabil und zerfällt wieder.

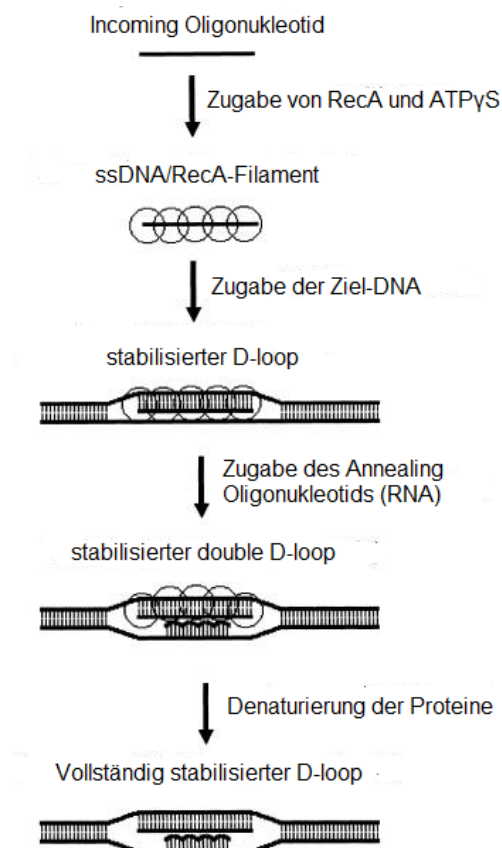


Abbildung 9 Stabilisierung der hybridisierten Sonde [Rice et al, 2004]

(1) Bildung eines Oligonukleotidfilamentes durch RecA und in Gegenwart eines nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon (ATPγS) (2) Durch die Zugabe des Nukleotidfilament zu der dsDNA katalysiert die RecA die Sequenz-abhängig Paarung und die Stranginvasion, wodurch ein sogenannter D-loop entsteht. (3) Der D-loop wird durch die Zugabe eines zweiten modifizierten Oligonukleotid, das komplementär zu dem verdrängten Strangs ist, stabilisiert. (4) Durch Dissoziation und Denaturierung der RecA entsteht ein stabiler double D-loop.

Im Allgemeinen sind Rückgrat-Modifikationen, die mehr DNA-artig sind weniger wirksam bei der Stabilisierung des Komplexes. Ursache für dieses Phänomen könnten enzymatische Prozesse der RecA oder eine verringerte thermodynamische Stabilität von DNA und Phosphorothioat-gebundenen DNA sein [Gamper et al, 2003]. Daher wurde zur Stabilisierung 2'-O-Methyl-RNA verwendet, bei der jeder 2'-OH-Rest der Ribose eine Methylgruppe trägt. Zuerst wurden 2 µl Oligonukleotidsonde Cy3-MRSA-Incoming (10 µM) zusammen mit der 0,6 µl RecA (2 mg/ml ~ 540 µM), 12 µl ATPγS (0,1 mM) und 2,5 µl RecA-Reaktionspuffer bei 37 °C inkubiert. Nach 10 Minuten wurde das entsprechende PCR-Produkt hinzugefügt, welches eine Biotinmarkierung trug. Nach weiteren 10 Minuten wurden 3,6 µl MRSA-Annealing-RNA (10 µM) dazu pipettiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Probe bei 4 °C auf Eis gestellt und 2 µl SDS (10 %) hinzugefügt wurden. Die Probe wurde auf einem Streptavidin-beschichteten Objektträger 20 Minuten inkubiert und mit ddH₂O gespült.

4.4.3 Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore™-Technik)

Mit dieser Technik ist es möglich, ein Bindungsereignis zweier unmarkierter Moleküle zu verfolgen (biomolecular interaction analysis, BIA) und die Reaktionskinetik zu charakterisieren. Das Grundprinzip dieses Biosensors beruht auf dem physikalischen Phänomen des Oberflächenplasmonresonanzeffekts. Eine im System integrierte kontinuierliche Fließzelle ist im Kontakt mit der Sensorchipoberfläche, eine goldbeschichtete Glasoberfläche, die mit einer hydrophilen carboxymethylierten Dextranoberfläche bedeckt ist. Zur Analyse von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen wird ein Interaktionspartner an der Sensoroberfläche immobilisiert. Nach der Bindung des Rezeptors strömt der Ligand durch die Fließzelle über die mit dem Rezeptor beschichtete Oberfläche. Kommt es zu einer Interaktion zwischen dem Rezeptor und einem Liganden, erhöhen sich der Beladungsgrad und somit auch die Schichtdicke an der Goldoberfläche. Diese Änderung wird über polarisiertes und monochromatisches Licht gemessen, welches auf die Goldschicht gestrahlt wird und an der es zur Totalreflexion kommt (Abb. 10). Dabei werden die Oberflächenelektronen, auch Plasmonen genannt, in dem dünnen Goldfilm in Schwingung versetzt und erzeugen eine Resonanz, die zur Intensitätsverminderung des reflektierten Lichtstrahls führt. Physikalische Basis des Messsystems ist eine geringe Veränderung des optischen Brechungsindex der Lösung in direkter Nähe zur funktionalisierten Goldschicht [Barnes et al, 2003]. Die Bindung des Analyten auf der Oberfläche verändert den Reflexionswinkel des Intensitätsabfalls des reflektierten Lichtes. Dieser Winkel ist direkt proportional zum Beladungsgrad der Goldoberfläche. Der veränderte Winkel wird mit einem DiodenArray-Detektor erfasst. Als Ausgabe erhält man ein Sensogramm, in dem das Signal der Resonanz-Einheit (Resonance Unit, RU) über die Zeit aufgetragen wird. Dabei entspricht 1 RU einer Masse von ca. 1 pg/mm^2 Protein bzw. $0,78 \text{ pg/mm}^2$ DNA. Sind zwei Messzellen in einem System parallel geschaltet, kann eine Zelle als Referenz genutzt werden, indem das Referenzsignal vom Probensignal abgezogen wird. So können unspezifische Bindungen bereinigt werden [Meyer, 2002].

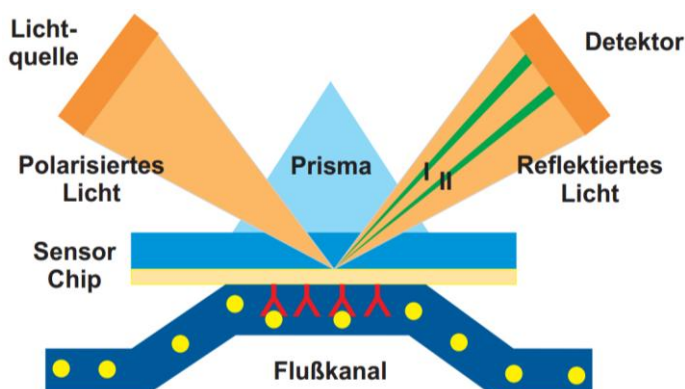


Abbildung 10 Aufbau und Detektionsmechanismus der BIAcore™-Technik [Meyer, 2002]

Der an den immobilisierten Liganden gebundene Analyt führt zur Änderung des Brechungsindex in der Fließzelle. Die Winkeländerung der Intensitätsverminderung des reflektierten Lichtes, unter dem die Oberflächenplasmonresonanz stattfindet, wird von einem optischen Detektor gemessen.

4.4.3.1 Bindungskinetik der RecA an dsDNA

Die Aktivierung beider Fließzellen erfolgte bei einer Flussrate von 5 µl/min mit sterilfiltriertem und entgastem ddH₂O. Die Dextranoberfläche wurden dazu mit 40 µl eines 1:1-Gemisches von 0,2 M N-Ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und 0,05 M N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Anschließend wurde die Oberfläche mit 2 µl Streptavidin (1 mg/ml) in 60 µl Natriumacetat (5 mM, pH 5,0) überschichtet. Zur Deaktivierung der Oberfläche wurde der Sensorchip mit 30 µl Ethanolamin (1 M, pH 8,5) gespült. Anschließend wurde an die Streptavidin-beschichtete Oberfläche der Fließzelle Fc2 biotinmarkierte dsDNA gekoppelt. Dazu wurde ein, unter Punkt 4.1.2 hergestelltes, Biotin-markiertes PCR-Produkt verwendet. Die Beschichtung erfolgte mit Laufpuffer bei einer Flussrate von 5 µl/min. Dazu wurden 22 µl amplifizierte DNA (22 ng/µl) in 30 µl Laufpuffer gelöst und 5 Minuten über die Fließzelle geströmt. Um unspezifische Bindungen zu lösen, wurde die Zelle zweimal mit SDS-Puffer (0,05 %) gespült.

Unterschiedliche RecA-Konzentrationen

Um die Bindungskinetik zwischen der gekoppelten dsDNA und der RecA zu messen wurden vier Ansätze mit 0 µl, 0,25 µl, 0,5 und 1 µl RecA (2 mg/ml) in 32 µl ATPγS (0,1 mM) und 32 µl Laufpuffer hergestellt. Die Überströmung erfolgte 3 Minuten bei einer Flussrate von 5 µl/min über beide Fließzellen. Die Dissoziationszeit betrug 5 Minuten, bis die Chipoberfläche zweimal mit 0,05 % SDS regeneriert wurde. Die Messwerte der Referenzfließzelle Fc2, die nur mit SA immobilisiert wurde, wurden von der aktiven Fließzelle Fc2 subtrahiert.

Vergleich von spezifischer und unspezifischer Sonde

Bei diesem Versuch sollte gezeigt werden, ob es Unterschiede in der Bindungskinetik zwischen einer spezifischen Sonde, also einem Oligonukleotid mit komplementärer Sequenz zu der auf der Chipoberfläche immobilisierten dsDNA, und einer unspezifischen Sonde gibt. Dazu wurden drei Proben hergestellt, eine mit 2,5 µl spezifische Sonde (100 µM), eine mit 2,5 µl unspezifischer Sonde und eine ohne Sonde. Zu den Ansätzen wurde 60 µl ATPγS, 0,5 µl RecA und 57 µl Laufpuffer gegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Fließzelle 2 mit den Proben überströmt. Nach einer Dissoziationszeit von 5 Minuten wurde die Chipoberfläche zweimal mit 0,05 % SDS regeneriert. Die Messwerte der Referenzfließzelle Fc2 wurden von der aktiven Fließzelle Fc2 subtrahiert.

Stabilisierende RNA

In diesen Versuch sollte gezeigt werden, ob die Verwendung einer stabilisierenden RNA-Sonde Einfluss auf die Bindungskinetik der RecA hat. Zuerst wurden 2,5 µl Oligonukleotidsonde Cy3-MRSA-Incoming (100 µM) zusammen mit der 0,5 µl RecA (2 mg/ml), 60 µl ATPγS (0,1 mM) und 57 µl Laufpuffer bei 37 °C inkubiert. Nach 10 Minuten wurden 2,5 µl MRSA-Annealing-RNA (10 µM) dazu pipettiert. Mit dieser Probe wurde Fließzelle 2 drei Minuten überströmt. Danach wurde die Chipoberfläche zweimal mit 0,05 % SDS gespült.

Vergleich von RecA Puffer und HEPES Puffer

Dieser Versuch sollte zeigen, welchen Einfluss der Reaktionspuffer auf das Bindungsverhalten der RecA hat. Dazu wurden 0,5 µl RecA (2 mg/ml) und 60 µl ATPγS (0,1 mM) zusammen pipettiert. Probe eins enthielt zusätzlich 59,5 µl HEPES-Laufpuffer und Probe zwei 12 µl RecA-Reaktionspuffer in 47,5 µl ddH₂O.

4.4.3.2 Bindungskinetik der RecA an ssDNA

Um die Bindungskinetik an ssDNA zu analysieren, wurde an die aktivierte Fließzelle 1 ein 23 Basenpaar langes einzelsträngiges Oligonukleotid gebunden. Dazu wurde Fc 2 300 sec mit einer Lösung aus 1 µl Biotin-MRSA-RPA-Primer und 60 µl Laufpuffer überspült. Danach wurde die Fließzelle zweimal mit einer 0,05 %igen SDS-Lösung gewaschen. Für den Versuch wurden vier Proben vorbereitet. Die erste Probe enthielt 0,5 µl RecA (2 mg/ml), 60 µl ATPγS (0,1 mM) und 59,5 µl HEPES-Laufpuffer. Die zweite Probe enthielt statt HEPES-Laufpuffer 12 µl RecA-Reaktionspuffer in 47,5 µl ddH₂O.

Die dritte und vierte Probe enthielt neben der RecA und ATP γ S noch 15 μ l unmarkiertes PCR-Produkt, um den Einfluss der Bindung an ssDNA bei Anwesenheit von dsDNA zu analysieren. Bei der dritten Probe wurde die Reaktion in HEPES-Puffer durchgeführt, die vierte enthielt RecA-Puffer. Die beiden Proben wurden vor der Analyse am BIAcore 10 Minuten bei 37 °C inkubiert.

5 Ergebnisse

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der Testmethoden zur Charakterisierung der LAMP und RPA hinsichtlich ihrer Reaktionskinetik, Nachweisgrenze und Reaktionsbedingungen erläutert. Des Weiteren werden die Resultate zur Bestimmung der Bindungskinetik der RecA aufgezeigt.

5.1 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Das Ergebnis der loop-mediated isothermal amplification wurde zunächst mit einer Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Abbildung 11 zeigt ein Gel, in dem in Spur eins amplifiziertes Produkt mit 0,1 ng/μl und in Spur zwei 0,2 ng/μl MRSA- DNA aufgetragen wurden. Da bei dieser Methode viele unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstanden, waren keine klaren Banden erkennbar, es bildete sich ein Schmierfilm über die gesamte Spur. Im Vergleich dazu war in der Negativkontrolle keine DNA erkennbar. Der Unterschied zwischen positiven und negativen Proben war deutlich zu erkennen. Aufgrund der hohen Spezifität der LAMP ist das Vorhandensein von amplifizierter DNA ein Indikator für die Anwesenheit von Target-DNA [Mori et al].

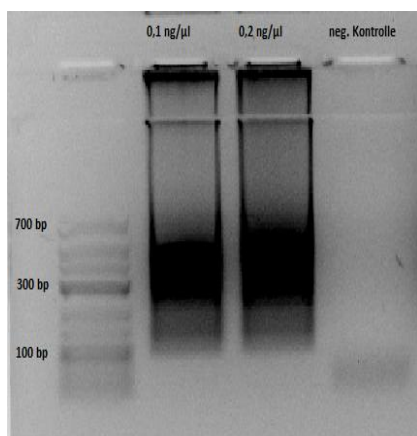


Abbildung 11 Elektrophoresegel einer LAMP

Dargestellt ist ein Elektrophoresegel von einer loop-mediated isothermal amplification. In der ersten Spur ist die Low Range DNA-Ladder aufgetragen, die zweite Spur enthält 0,1 ng/μl MRSA-DNA, die dritte 0,2 ng/μl. Die letzte Spur ist die Negativkontrolle.

5.1.1 Visualisierung der LAMP mit Calcein

Durch die Zugabe des Calcein bei der LAMP war nach der Amplifikation in den positiven Proben eine deutlich höhere Fluoreszenz unter UV-Licht zu beobachten. Abbildung 12a zeigt eine Aufnahme mit Proben unterschiedlicher DNA-Konzentrationen. Die Negativkontrolle zeigte nur eine schwache Fluoreszenz und mit aufsteigender Konzentration nahm die Lichtemission deutlich zu. Durch mehrere Testreihen wurde gezeigt, dass diese Detektionsmethode reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Die Nachweisgrenze lag bei 0,001 ng/µl, bei einer niedrigeren Konzentration war der Unterschied in der Fluoreszenz zwischen positiven und negativen Proben nicht mehr deutlich genug ausgeprägt.

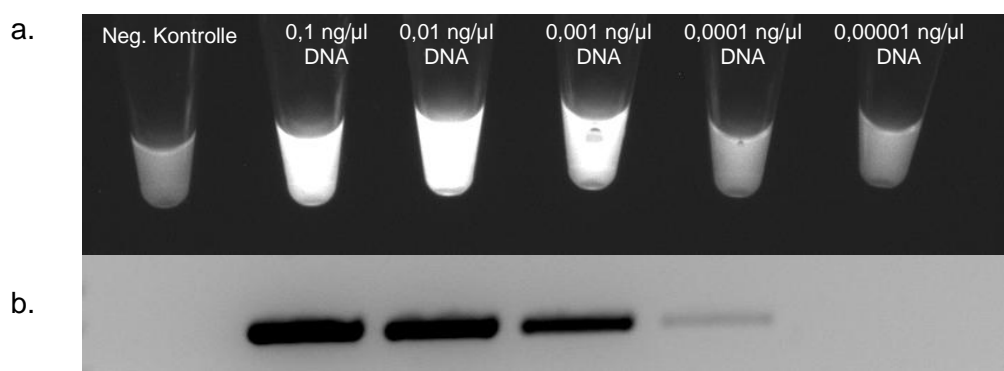


Abbildung 12 Nachweisgrenze einer LAMP mit Calcein im Vergleich zur PCR

Bild a. zeigt die Reaktionsgefäße einer loop-mediated isothermal amplification mit Calcein bei einer Wellenlänge von 312 nm. Das erste Gefäß ist die Negativkontrolle, danach sind fünf Gefäße mit aufsteigender Konzentration MRSA-DNA von 0,1 ng/µl bis 0,00001 ng/µl abgebildet. Die niedrigste Konzentration, bei der noch ein erhöhtes Fluoreszenzsignal festgestellt werden kann, ist 0,001 ng/µl. Abbildung b. zeigt den Vergleich der Sensitivität gegenüber einer herkömmlichen PCR. Zu sehen ist ein Elektrophoresegel einer PCR, wobei die Spuren jeweils die gleiche Menge an MRSA-DNA enthalten.

5.1.2 Visualisierung der LAMP mit HNB

Da Metallindikatoren auch pH-Indikatoren sind, muss bei der HNB-Detektion ein pH-Wert von 10 eingestellt werden [Goto et al, 2009]. Für den LAMP-Ansatz wurden die Betainkonzentrationen und die Menge an dNTPs reduziert, um dies zu erreichen. Dadurch verlangsamte sich die Reaktion, ein Farbumschlag von lila zu blau wurde erst nach einer Inkubation von 100 Minuten beobachtet (Abb. 13). Bei dieser Detektionsmethode war die Sensitivität nicht so hoch und die Nachweisgrenze lag bei ca. 0,1 bis 0,2 ng/µl. Außerdem war HNB störanfällig gegenüber Veränderungen in der Zusammensetzung des Ansatzes. Die farblichen Unterschiede zwischen positiven und negativen Proben waren teilweise nicht optimal erkennbar.

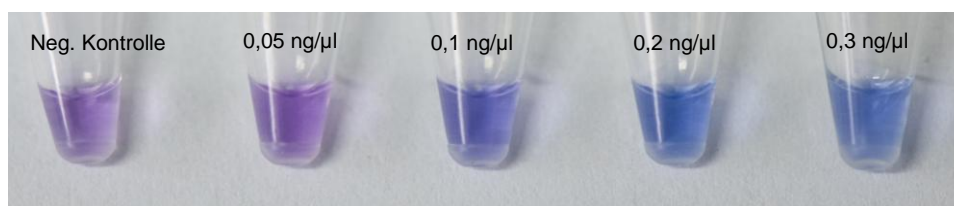


Abbildung 13 Detektion einer LAMP mit Hydroxynaphtholblau

Dargestellt sind die Reaktionsgefäße einer LAMP, die mit Hydroxynaphtholblau visualisiert wurden. Das erste Gefäß enthält die Negativkontrolle, danach sind vier Gefäße mit einer aufsteigenden Konzentration von 0,05 ng/µl bis 0,3 ng/µl an MRSA-DNA abgebildet.

5.1.3 Optimierung der LAMP durch zwei weitere Primer

Mit 90 Minuten dauert die Loop mediated isothermal amplification vergleichbar lang wie eine herkömmliche PCR. Um die Schnelligkeit und die Spezifität der Reaktion zu verbessern, wurde der Einsatz von zwei weiteren Primern getestet [Xua et al, 2011]. Um die Effektivität der zwei zusätzlichen LAMP-Primer zu überprüfen, wurde die Reaktion in Echtzeit am Lightcycler verfolgt. Zum Vergleich wurden vier Ansätze von 0,1 ng/µl bis 0,6 ng/µl DNA jeweils mit vier und mit sechs Primern angesetzt. Der Kurvenverlauf in Abbildung 14 zeigt eine deutliche Verbesserung der Reaktionszeit bei den Ansätzen, die sechs Primer enthielten (B1-B4). Im Vergleich mit den Proben, die vier Primer enthielten, erfolgte ein schnellerer und auch höherer Anstieg der Fluoreszenz. Die absteigende DNA Konzentration der Proben zeigte nur eine kleine Verschiebung der Reaktionszeit, die Höhe des Anstiegs wurde dadurch nur gering beeinflusst. Im Durchschnitt begann die Amplifikation nach dem 35. Zyklus, das entspricht 44 Minuten. Bei den Proben mit den vier Primern bewirkten die unterschiedlichen DNA-Konzentrationen eine deutliche Beeinflussung des Kurvenverlaufs. Bei niedriger Konzentration erfolgte der Anstieg der Fluoreszenz nach dem 65. Zyklus (80 Minuten). Bei höheren Konzentrationen war ein Anstieg nach etwa 40-45 Zyklen (50-55 Minuten) zu beobachten. Auch die Höhe des Anstiegs und damit die Intensität der Fluoreszenz nahmen mit sinkender DNA-Konzentration ab. Das zeigt an, dass weniger DNA amplifiziert wurde.

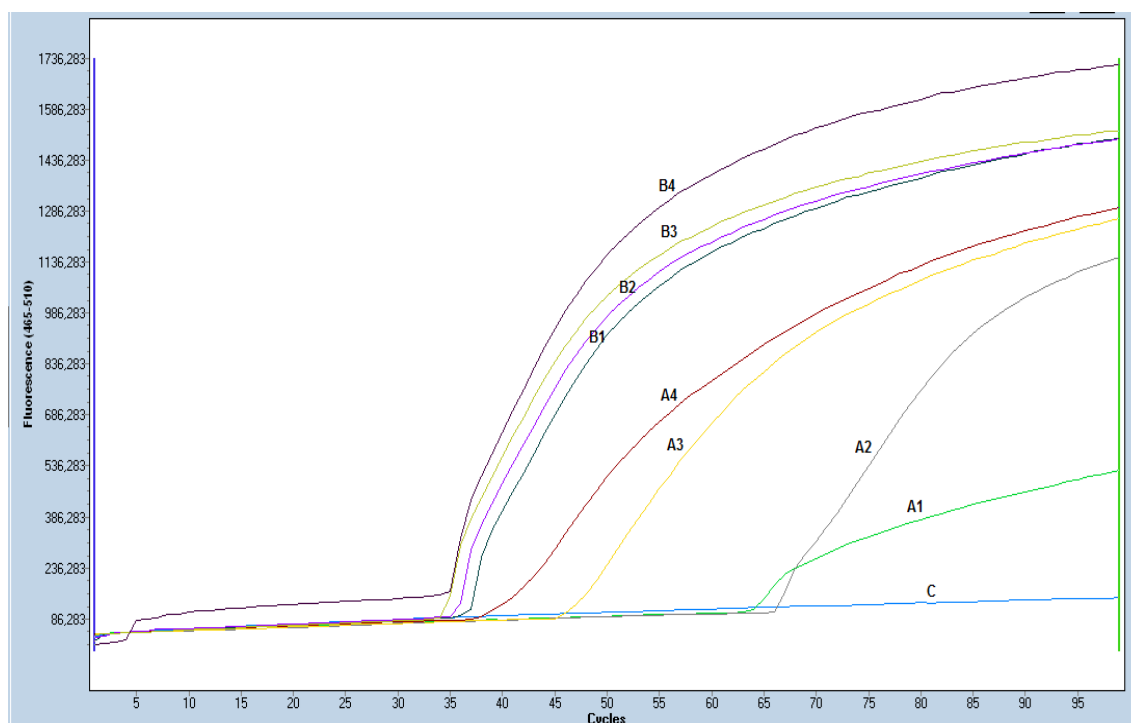


Abbildung 14 Real-Time-LAMP mit vier Primern (A1 - A4) und mit sechs Primern (B1 – B4)

Die Abbildung zeigt den Kurvenverlauf einer Real-Time-LAMP mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein. Zehn Zyklen entsprechen 12,5 Minuten. Die Kurven A1 bis A4 stellen die Messreihe mit vier Primern dar, mit 0,1 ng/μl DNA (A1), 0,3 ng/μl DNA (A2), 0,4 ng/μl DNA (A3) und 0,6 ng/μl DNA (A4). Messreihe B enthält sechs Primer mit 0,1 ng/μl DNA (B1), 0,3 ng/μl DNA (B2), 0,4 ng/μl DNA (B3) und 0,6 ng/μl DNA (B4). Kurve (C) stellt die Negativkontrolle dar.

5.2 Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

5.2.1 Denaturierung störender Proteine

Bei der RPA waren nach der Amplifikationsreaktion die Proteine Recombinase und SSB noch an die DNA gebunden, wodurch eine elektrophoretische Auftrennung der DNA nicht möglich war. Eine DNA-Aufreinigung war notwendig, um eine klare Produktbande im Elektrophoresegele zu erhalten. Dies konnte mit konventionellen DNA-Aufreinigungskits erreicht werden. Dazu musste das amplifizierte Produkt aus dem Reaktionsgefäß entnommen und störenden Proteine über eine Säule entfernt werden. Dies beanspruchte einen hohen zeitlichen Aufwand, aber das dabei weitaus größere Problem war die Kontaminationsgefahr. Daher musste eine effektivere Methode gefunden werden, um die störenden Proteine aus der Probe zu entfernen und das amplifizierte Produkt mit Hilfe der Elektrophorese darstellen zu können. Die Methode der Hitzedenaturierung zeigte eine Verbesserung der elektrophoretischen Auftrennung, es waren im Vergleich zur unbehandelten Probe abgegrenzte Banden zu erkennen (Abb. 15, 2a-b). Die Säuredenaturierung brachte nicht den erwünschten Erfolg, die DNA wurde nicht aufgetrennt. Die Zugabe von Natriumhydroxid zeigte bei der niedrigsten Konzentration

(Abb. 15, 5a) eine Bande, jedoch ist ein DNA-Shift zu erkennen. Als wirkungsvollste Methode hat sich die Zugabe von Proteinase K gezeigt (Abb. 15, 3a-c). Die Banden sind klar abgetrennt, es ist kein DNA-Shift mehr zu erkennen und die Banden sind sehr ausgeprägt, was darauf hindeutet, dass die DNA nicht zerstört wurde.

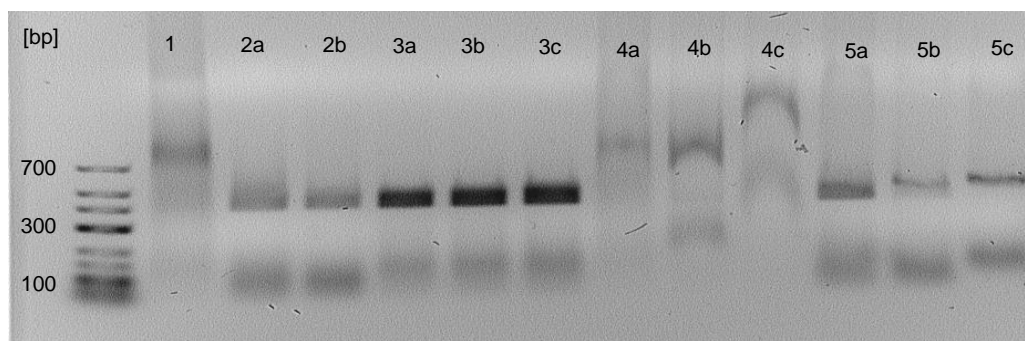


Abbildung 15 Elektrophoresegel nach Applikation unterschiedlicher Denaturierungsmethoden

Die Abbildung zeigt die Auswertung verschiedener Denaturierungsmethoden nach Ablauf der RPA-Reaktion. Spur 1 entspricht der unbehandelten Probe, Spur 2a und 2b stellt die Hitzedenaturierung bei 95 °C dar. Bei Spur 3a, 3b und 3c wurden nach der Amplifikation unterschiedliche Konzentrationen an Proteinase K hinzugefügt. Spur 4a bis 4c zeigt die Säuredenaturierung und bei Spur 5a bis c die Denaturierung durch Erhöhung des pH-Werts.

5.2.2 Nachweisgrenze

Um die Sensitivität der Recombinase Polymerase Amplifikation zu überprüfen, wurden 5 Ansätze mit absteigender DNA-Konzentration hergestellt. Die Nachweisgrenze der RPA lag bei 0,05 ng gDNA (Abb. 16a.). Im Vergleich zur konventionellen PCR, bei der die Nachweisgrenze bei 0,005 ng lag, war die RPA 10fach weniger sensitiv. Die Inkubationszeit der RPA betrug 30 Minuten, die der PCR 90 Minuten.

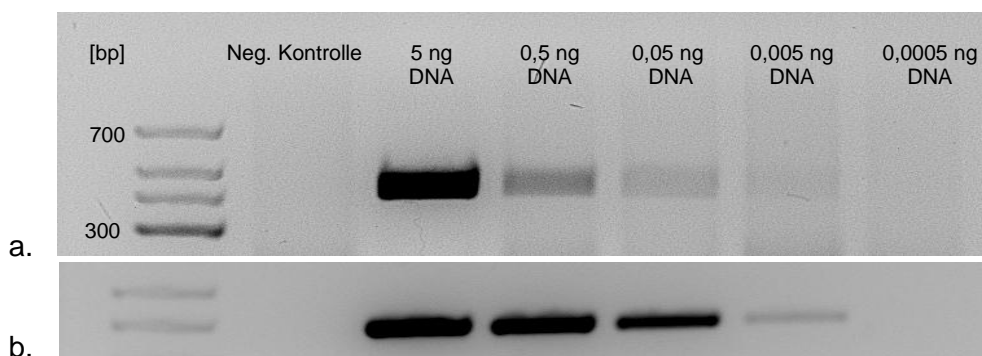


Abbildung 16 Nachweisgrenze der RPA (a.) im Vergleich zur PCR (b.)

Die Abbildung zeigt das Elektrophoresegel zur Bestimmung der minimal detektieren DNA-Konzentration (16a.) im Vergleich zur Nachweisgrenze einer herkömmlichen PCR (16b.).

5.2.3 Temperaturgradient

Die Gradienten-RPA zeigte, dass die minimale Temperatur, bei der noch Produkt amplifiziert wurde, bei 30 °C lag (Abb. 17). Die Bandenstärke nahm von 37 °C bis 30 °C nur geringfügig ab, bei einer Temperatur von 27 °C war nur noch eine schwache Bande zu erkennen. Bei 24 °C wurde kein Produkt mehr amplifiziert. Dies zeigte, dass eine Amplifikation bei Zimmertemperatur mit dieser Methode nicht möglich war.

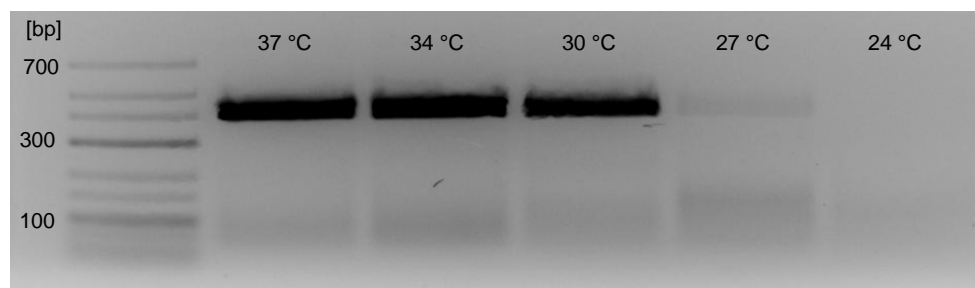


Abbildung 17 Elektrophoresegel einer Gradienten-RPA

Dargestellt ist das Elektrophoresegel zur Bestimmung der minimalen Inkubationstemperatur, bei der noch Produkt amplifiziert wird.

5.2.4 Reaktionszeit

Die Auswertung der Ergebnisse über die Inkubationszeit der RPA zeigte, dass bereits nach 10 Minuten nachweisbar Produkt amplifiziert wurde (Abb. 18). Die Bande war noch etwas schwach, aber nach 20 Minuten wurde eine ausreichende Menge DNA amplifiziert. Nach 40 Minuten waren neben der charakteristischen Bande weitere Banden erkennbar, die mit steigender Reaktionszeit immer deutlicher ausgeprägt waren. Das zeigte, dass bei Überschreiten der Inkubationszeit von 30 Minuten vermehrt unspezifische DNA amplifiziert wurde.

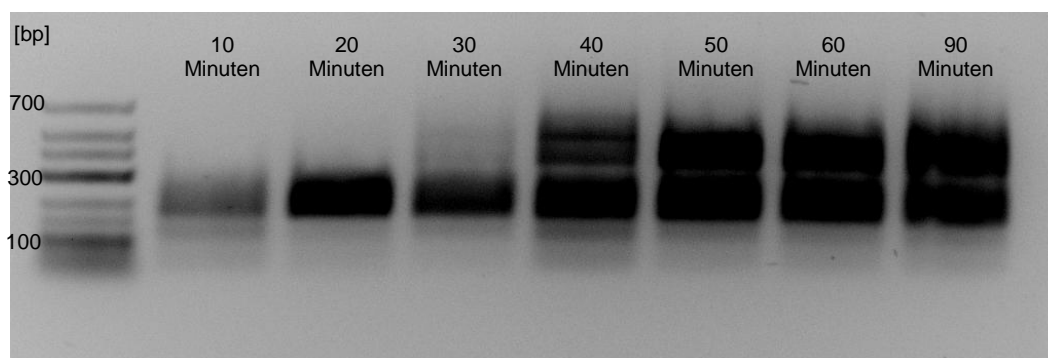


Abbildung 18 Elektrophoresegel von RPAs bei unterschiedlichen Inkubationszeiten

Abgebildet ist ein Elektrophoresegel zur Bestimmung der optimalen Reaktionszeit. Bei einer Inkubationszeit von 10, 20 und 30 Minuten ist nur die Produktbande erkennbar (Spur 1-3). Alle Proben die länger inkubiert wurden, zeigten unspezifische Banden (Spur 4-7).

5.2.5 SATamra-Sonde

In Abbildung 19 ist das Ergebnis einer Real-Time-RPA unter Verwendung der SATamra-Sonde abgebildet. Generell war die Signalstärke sehr niedrig, der Unterschied zur Negativkontrolle war nicht deutlich ausgeprägt. Unter Verwendung des Primerpaares ScclIII mit orfX war nur ein schwaches Signal entstanden. Unter Einsatz des Primer Sccl/II wurde ein stärkeres Fluoreszenzsignal hervorgerufen. Das stärkste Signal konnte bei der Kombination aus Sccl/II mit ScclIII und orfX gemessen werden.

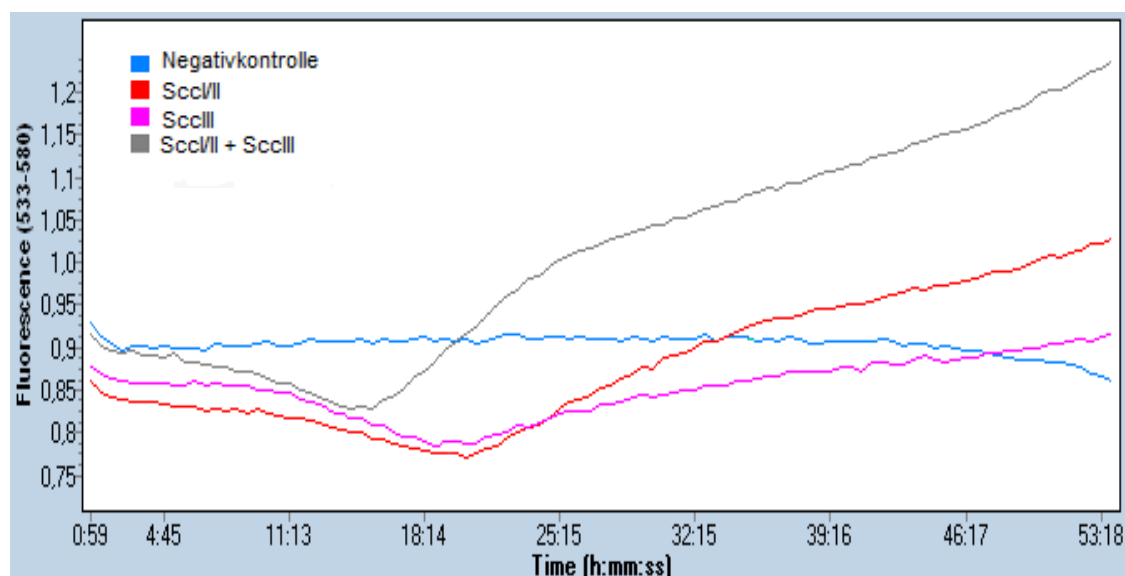


Abbildung 19 Real-Time-RPA mit der SATamra-Sonde

Die Abbildung zeigt den Reaktionsverlauf einer Real-Time RPA mit unterschiedlichen Primer-Kombinationen. Zur Detektion wurde die SATamra-Sonde verwendet.

5.2.6 Lagerungsstabilität

Für die weitere Produktentwicklung eines teststreifen-basierenden Nachweisverfahrens ist die Lagerungsstabilität von essentieller Bedeutung. Hier sollten einige initiale Experimente die Funktionalität der RPA nach einer Aufbewahrung der Reagenzien bei 4 °C und 20 °C charakterisieren.

Nach vier Wochen

Die lyophilisierten Reagenzien des TwistAmp Kits wurden vier Wochen bei einer Temperatur von -20 °C (vom Hersteller empfohlen), 4 °C (Kühlschranktemperatur) und 20 °C (Raumtemperatur) gelagert. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis einer RPA nach Ablauf der Lagerungszeit von vier Wochen. Bei allen drei Lagerungstemperaturen wurde ein RPA-Produkt amplifiziert. Die stärkste Bande war bei der Lagerung bei

Raumtemperatur zu beobachten. Eine schwächere Bande zeigte die Lagerung im Kühlschrank, bei der weniger Produkt amplifiziert wurde.

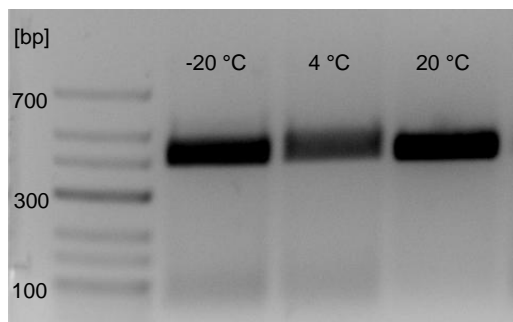


Abbildung 20 Lagerungsstabilität nach vier Wochen

Die Abbildung zeigt ein Elektrophoresegel zur Bestimmung der Lagerungsstabilität bei 4 °C und 20 °C nach vier Wochen.

Nach acht Wochen

Nach Ablauf der achtwöchigen Lagerungszeit waren auf dem Elektrophoresegel alle drei Banden deutlich zu erkennen (Abb. 21). Die stärkste Bande war bei der vom Hersteller empfohlenen Lagerung bei -20 °C zu sehen. Die Lagerung bei Raumtemperatur zeigte auch nach acht Wochen eine bessere Amplifikation als bei einer Lagerung bei 4 °C.

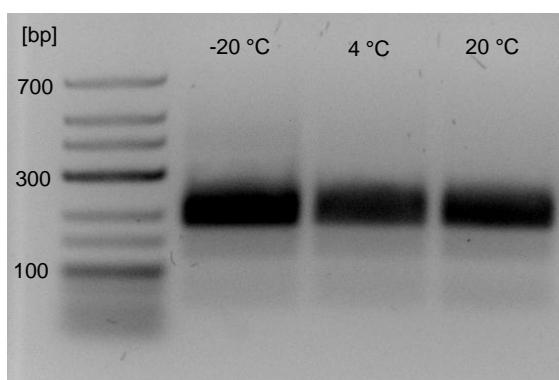


Abbildung 21 Lagerungsstabilität nach acht Wochen

Dargestellt ist ein Elektrophoresegel einer RPA, nachdem das lyophilisierte Reagenz acht Wochen bei 4 °C und 20 °C aufbewahrt wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die RPA-Reagenzien selbst bei einer Lagerung von acht Wochen bei Raumtemperatur stabil sind.

5.3 RecA

5.3.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Um die Binding zwischen doppelsträngiger DNA und der RecA nachzuweisen, wurde amplifiziertes PCR-Produkt und das Enzym bei 37 °C inkubiert und auf ein Agarosegel aufgetragen. In Abbildung 22 ist das Ergebnis der Elektrophorese dargestellt. Die erste Spur zeigt die Inkubation ohne in ddH₂O, die zweite Spur mit RecA-Puffer und die letzte Probe enthielt nur PCR-Produkt ohne RecA. Bei Spur eins war ein deutlicher DNA-Shift zu erkennen, die Produktbande bei ca. 400 bp war kaum noch sichtbar. Die zweite Spur zeigte hingegen nur einen schwachen Shift, der nur im Vergleich zur Spur 3 erkennbar war. Die Produktbande war noch fast vollständig erhalten geblieben. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Bindung der RecA an Doppelstrang-DNA bei der Reaktion in RecA-Reaktionspuffer geringer ist als bei der Inkubation in ddH₂O.

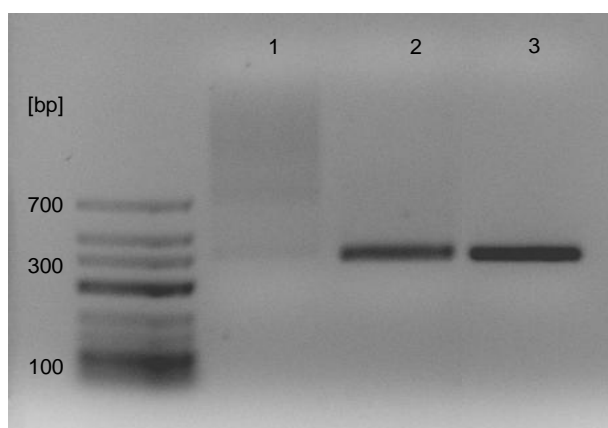


Abbildung 22 Elektrophoresegel eines EMSA mit und ohne RecA-Puffer

In Spur eins wurde die RecA und die dsDNA in RecA-Puffer inkubiert, bei Spur zwei erfolgte die Inkubation in Wasser und die letzte Spur enthielt keine RecA.

Um zu testen, welche Komponente des Reaktionspuffers die Bindung der RecA an dsDNA beeinflusst, wurden die Bestandteile des Puffers einzeln in den Reaktionsansatz gegeben und ein EMSA durchgeführt (Abb. 23). Spur eins zeigt die Probe mit RecA-Puffer, in Probe zwei wurde der Bestandteil DTT hinzugefügt, bei Probe drei wurde der Einfluss des enthaltenen MgCl₂ getestet und Spur vier zeigt eine Probe mit Tris-HCl-Puffer. DTT (Spur 2) hatte keinen negativen Einfluss auf die dsDNA-Bindung, ein vollständiger Shift war zu sehen. Die Zugabe von MgCl₂ zeigte einen kleinen Shift, aber der Großteil der DNA lag ungebunden vor und erzeugte eine Bande bei 400 bp. Die stärkste Hemmung der Bindung zwischen DNA und RecA war bei der Zugabe von Tris-

HCl-Puffer zu beobachten. Das zeigte, dass sowohl das in dem RecA-Puffer enthaltenen MgCl_2 und der Tris-HCl Puffer die Bindung der RecA an dsDNA negativ beeinflussen.

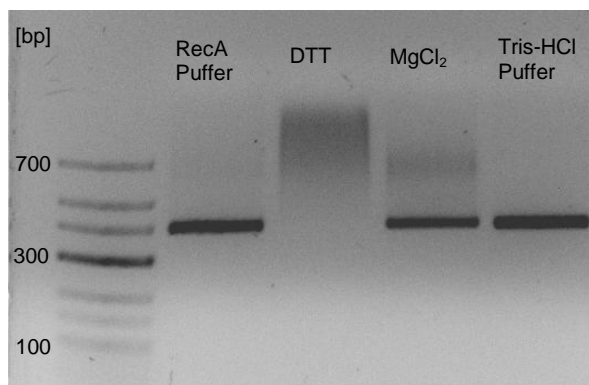


Abbildung 23 EMSA mit den einzelnen Bestandteilen des RecA-Puffers

Um ausschließen zu können, dass die gezeigte Bindung der RecA in ddH_2O nur durch eine pH-Wertveränderung zustande kommt, wurden weitere EMSAs durchgeführt, bei dem die Reaktion in unterschiedlichen Puffern abgelaufen ist (Abb. 24). Spur eins zeigt die Inkubation mit RecA-Puffer, Spur zwei mit HEPES-Puffer und die dritte Probe enthielt keinen Puffer. Bei diesem Versuch war zu sehen, dass der RecA-Puffer den Shift hemmt, wohingegen der HEPES-Puffer im Vergleich zur Probe ohne Puffer (Spur 3) den Shift fördert. Da beide Puffer auf den gleichen pH-Wert eingestellt wurden, konnte gezeigt werden, dass die schlechtere Bindung der RecA bei Anwesenheit des RecA-Puffers nicht durch den pH-Wert bedingt war.

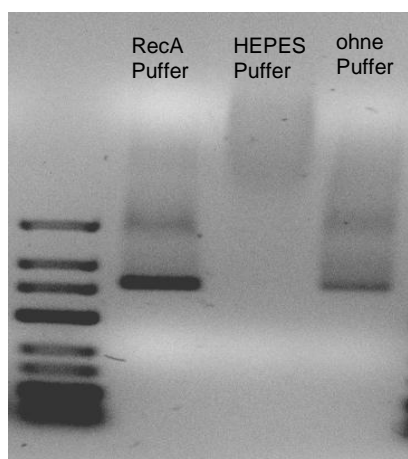


Abbildung 24 Vergleich der elektrophoretischen Mobilität in RecA-Puffer, HEPES-Puffer und ohne Puffer

Zusammenfassen kann man sagen, dass man mit Hilfe der Methode des Gelshifts deutlich erkennen kann, unter welchen Bedingungen die RecA dsDNA bindet. Das

Ergebnis diene als Grundlage für weitere Untersuchungen mit dem Ziel der Erhöhung der Spezifität der RPA.

Bindungsnachweis an ssDNA

Die Auswertung der EMSAs zum Nachweis der Bindung der RecA an ssDNA zeigte keinen elektrophoretischen Shift. Die Banden waren noch deutlich erkennbar und es konnte keine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

5.3.2 Nachweis markierter Oligonukleotide auf silanisierten und Streptavidin-beschichteten Objektträgern

Nachweis eines Biotin- und Cy3- markierten PCR-Produkt

Mit diesem Test soll gezeigt werden, ob ein PCR-Produkt, welches mit Biotin- und Cy3 markiert wurde, an die Oberfläche des Streptavidin-beschichteten OT bindet. Die Negativkontrolle, die ein Cy3-markiertes Oligonukleotid und ein Biotin-markiertes Oligonukleotid enthielt, soll möglichst kein Fluoreszenzsignal zeigen. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Probe mit dem PCR-Produkt (Abb. 25a.) zeigte im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 25b.) eine deutlich höhere Fluoreszenz. Bei der Kontrolle war nur eine schwache Hintergrundfluoreszenz nachweisbar. Die Cy3-markierten Oligonukleotide haben somit nicht unspezifisch an die beschichtete Glasoberfläche gebunden oder haben mit den Biotin-markierten Oligonukleotiden Dimere gebildet.

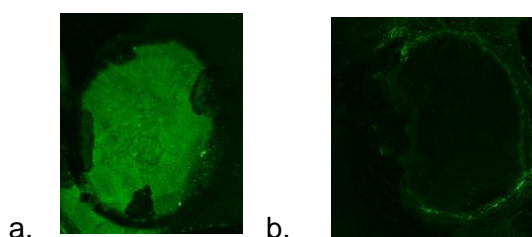


Abbildung 25 Nachweis eines Biotin- und Cy3- markierten PCR-Produkts

Bild a. zeigt die Probe mit Biotin- und Cy3-markierten Produkt, Bild b. stellt die Negativkontrolle dar, die nur CY3-markierte Oligonukleotiden und Biotin-markierten Oligonukleotiden enthielt

Einbau einer Fluoreszenzsonde in PCR-Produkt durch die RecA

Hier soll getestet werden, ob die RecA eine Cy3-markierte Oligonukleotidsonde in ein Biotin-markiertes PCR-Produkt einbaut. Die Positivkontrolle (Abb. 26a.), in der bereits Biotin- und Cy3-markiertes PCR-Produkt enthalten war, zeigte ein hohes Fluoreszenzsignal. Die Probe (Abb. 26b.), mit der ein Einbau der Cy3-markierten Sonde nachgewiesen werden sollte, zeigte kein Signal. Die Fluoreszenz war vergleichbar mit der

Negativkontrolle (Abb. 26c). Somit konnte der Einbau der Sonde durch die RecA mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.



Abbildung 26 Einbaus einer Fluoreszenzsonde in PCR-Produkt durch die RecA

Bild a. zeigt die Positivkontrolle, bei Bild b. sollte eine Cy3-markierten Sonde in ein Biotin-markiertes PCR-Produkt eingebaut werden und c. war die Negativkontrolle.

Einbau einer Fluoreszenzsonde durch die RecA, stabilisiert durch RNA

Bei diesem Versuch zeigte die Positivkontrolle ein weniger starkes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu vorherigen Versuchen (Abb. 27a.). Die Probe, bei der eine Stabilisierung der ssDNA/dsDNA-Tripelhelix durch eine RNA-Sonde vorgenommen wurde, zeigte ein nicht ganz Eindeutiges Ergebnis (Abb. 27b.). Die Fluoreszenz des Spots war nicht so hoch wie die der Positivkontrolle, aber im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 27c.) war ein Unterschied erkennbar. Dieses Resultat sollte durch weitere Tests reproduziert werden.

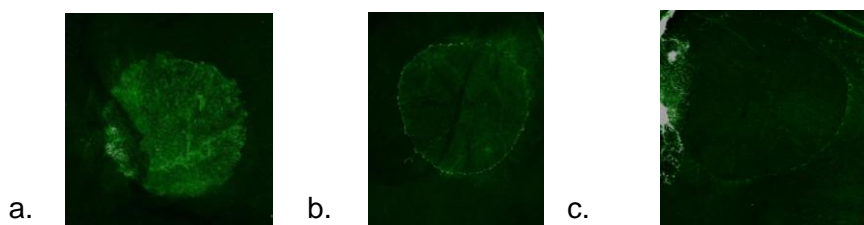


Abbildung 27 Einbau einer Fluoreszenzsonde durch die RecA, stabilisiert durch RNA

Bild a. zeigt die Positivkontrolle, Probe b. enthielt eine Cy3-markierten Sonde die in ein Biotin-markiertes PCR-Produkt eingebaut werden sollte und die mit RNA stabilisiert wurde. Bild c. zeigt die Negativkontrolle.

5.3.3 Oberflächenplasmonresonanz (BIAcore™-Technik)

Durch die Tests am BIAcore sollen die Bindungskinetik der RecA zu ssDNA und dsDNA näher Charakterisiert werden. Durch Verwendung unterschiedlicher Puffer sollen die optimalen Bindungsbedingungen bestimmt werden. Weiter soll der Einfluss verschiedener Sonden auf die Bindungskinetik der RecA getestet werden, mit dem Ziel, Aussagen über die Anwendbarkeit der RecA zur Sondenhybridisierung treffen zu können.

5.3.3.1 Bindungskinetik der RecA an dsDNA

Vor der eigentlichen Messung erfolgte die Präparierung der Sensoroberflächen. Nach der Aktivierung der Dextranoberfläche wurde 824 RU Streptavidin auf der Fließzelle 2 gebunden (Abb. 28a.). 1000 RU entsprechen 1 ng/mm^2 Protein [Meyer, 2002], daraus ergab sich bei einem Molekulargewicht des Streptavidins von 60.000 g/mol [Green, 1975] eine Beladung von $8,27 \cdot 10^9$ Molekülen pro mm^2 . An diese Oberfläche konnte anschließend 288 RU doppelsträngige DNA gebunden werden (Abb. 28b.). Das Molekulargewicht dieses amplifizierten PCR-Produkts betrug 256761 g/mol . Bei DNA entsprechen 1000 RU etwa $0,78 \text{ ng/mm}^2$ DNA [Meyer, 2002]. Daraus ergab sich eine Beladung von $5,27 \cdot 10^8$ Molekülen pro mm^2 . Das Verhältnis zwischen Streptavidin und DNA betrug somit 16:1.

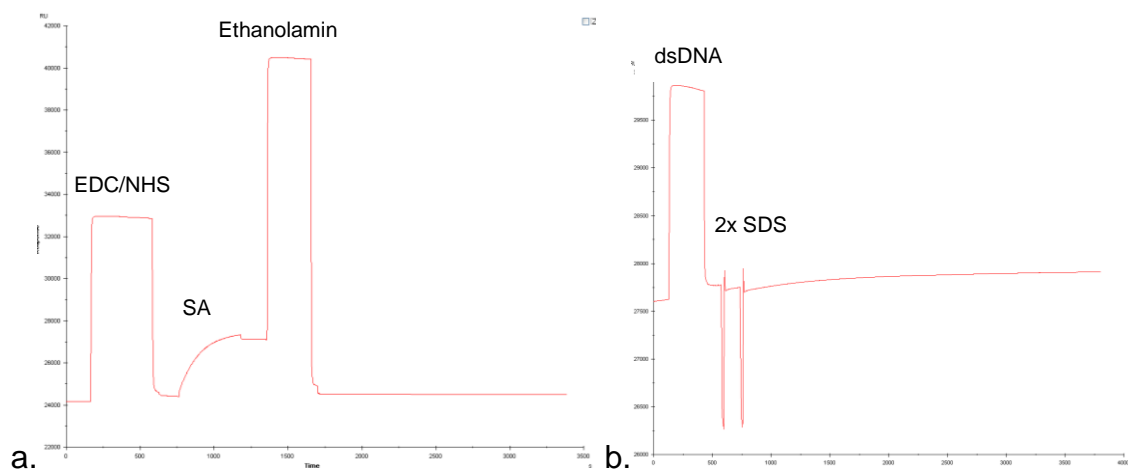


Abbildung 28 Beispiel eines Sensogramms zur Aktivierung der Sensoroberfläche und Immobilisierung der Oberfläche mit DNA

Bild a. zeigt die Aktivierung mit anschließender Streptavidin-Bindung und Absättigung der Carboxymethyldextranoberfläche. In Bild b. ist Immobilisierung eines Biotin-markierten PCR-Produkts an das auf der Oberfläche kovalent gebundene SA mit anschließender zweimaliger Spülung mit SDS dargestellt.

Unterschiedliche RecA-Konzentrationen

Die Auswertung des Sensogramms zeigte, dass während der Überströmungsphase die unterschiedlichen Konzentrationen an RecA einen Einfluss auf die Höhe der Kurven haben. Je mehr RecA in der Probe enthalten war, desto höher war das Resonanzsignal (Abb. 29). Während der Dissoziationsphase zeigten die Proben keine Unterschiede, die Signalstärke war bei allen Konzentrationen etwa gleich und lag bei ca. 700 RU. Bei einem Molekulargewicht der RecA von 37800 g/mol [Cox et al., 1981] ergab das eine Bindung von $1,1 \cdot 10^{10}$ Molekülen pro mm^2 . Die Oberfläche wurde somit schon bei der kleinsten eingesetzten Konzentration an RecA abgesättigt.

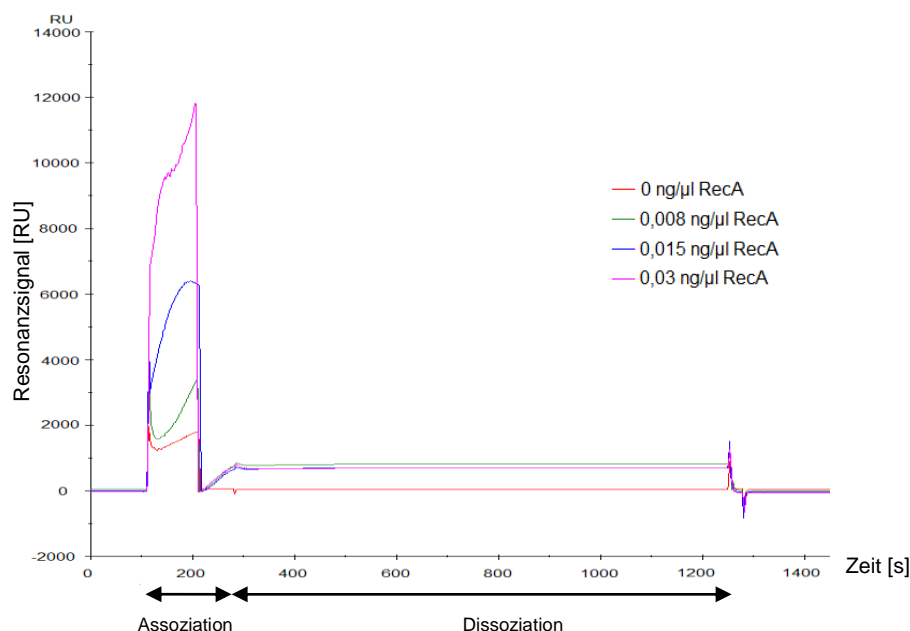


Abbildung 29 Sensogramm unterschiedlicher RecA-Konzentrationen

Die Abbildung zeigt das Resonanzsignal von 4 Proben mit 0 ng/μl RecA (rot), 0,008 ng/μl RecA (grün), 0,015 ng/μl RecA (blau) und 0,03 ng/μl RecA (rosa).

Vergleich von spezifischer und. unspezifischer Sonde

Bei diesem Versuch sollte gezeigt werden, ob es Unterschiede in der Bindungskinetik zwischen einer spezifischen Sonde, also einem Oligonukleotid mit komplementärer Sequenz zu der auf der Chipoberfläche immobilisierten dsDNA, und einer unspezifischen Sonde gab. Die Auswertung des Sensogramms zeigte, dass die Bindung der RecA durch die Anwesenheit von ssDNA beeinflusst wurde (Abb. 30). Die Bindung an die dsDNA verschlechterte sich, wenn die RecA zuvor mit einem Oligonukleotid inkubiert wurde. Die Probe, die nur RecA enthielt, zeigte die höchste Signalstärke mit 973 RU. Das entsprach $1,55 \cdot 10^{10}$ mol/mm² und das Verhältnis zwischen DNA und gebundener RecA war 1:29. Somit haben ca. 29 RecA Moleküle an einem amplifizierten Produkt gebunden. Die Auswertung der spezifischen Sonde ergab ein Bindungsverhältnis von 1:(8,1). Bei der vorherigen Inkubation der RecA mit einer unspezifischen Sonde war das Resonanzsignal am geringsten und das Verhältnis verschlechterte sich auf 1:(3,3). Die Bindung an die dsDNA war somit besser, wenn die RecA zuvor mit der spezifischen Sonde inkubiert wurde.

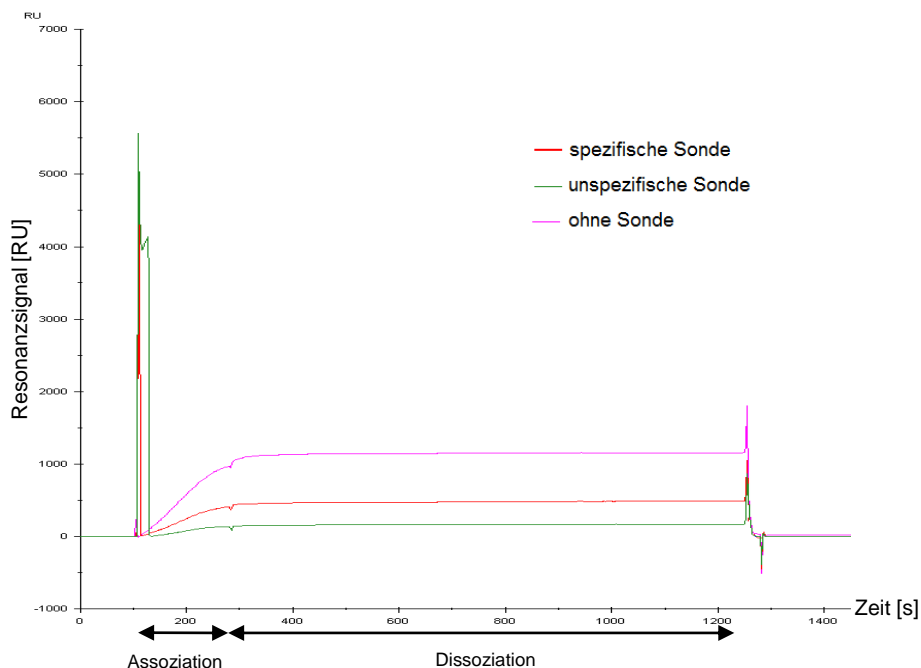


Abbildung 30 Vergleich der Bindung mit spezifischer und unspezifischer Sonde

Das Sensogramm zeigt die Signalstärke der Probe der RecA mit einer spezifischen Oligonukleotidsonde (rot), einer unspezifischen (grün) und ohne eine Sonde (rosa).

Stabilisierende RNA

Dieser Versuch sollte zeigen, ob die Inkubation mit einer stabilisierenden RNA-Sonde eine Wirkung auf die Bindungskinetik hat. Die zusätzliche Inkubation der Probe mit RecA und spezifischer Sonde mit der methylierten RNA zeigte keinen positiven Einfluss auf die Bindungskinetik (Abb. 31). Die Signalstärke blieb unverändert.

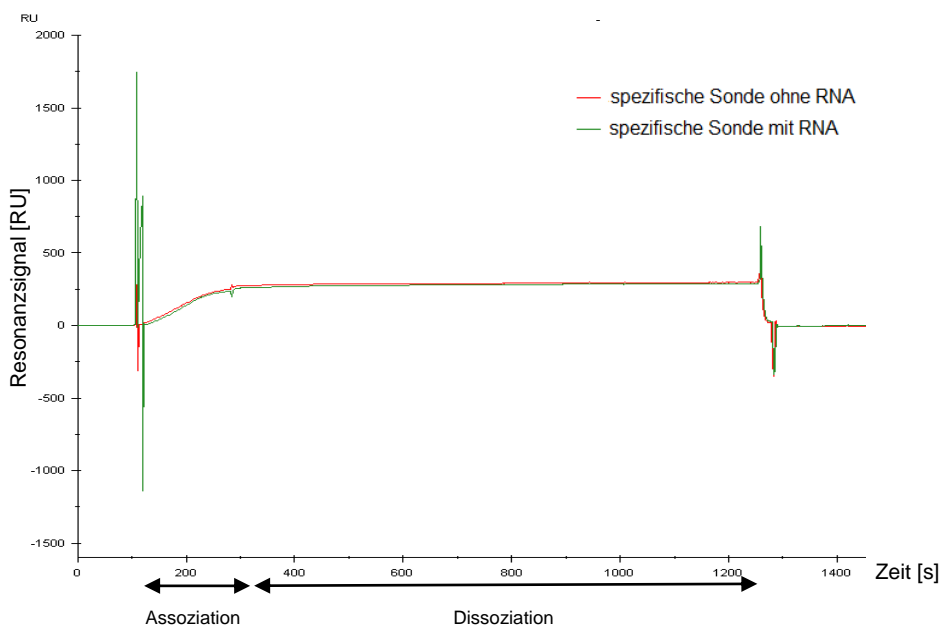


Abbildung 31 Einfluss der Bindungskinetik durch stabilisierende RNA

Die rote Kurve zeigt das Resonanzsignal der Probe mit RecA und spezifischer Sonde dar, die grüne Kurve die Probe mit zusätzlicher stabilisierender RNA.

Vergleich von RecA Puffer und HEPES Puffer

Die Analyse über den Einfluss unterschiedlicher Puffer auf das Bindungsverhalten der RecA an dsDNA ergab, dass die Bindung stark vom verwendeten Puffer abhängt. Bei der Verwendung von HEPES-Puffer konnten 1079 RU gemessen werden, das entsprach $1,72 \cdot 10^{10}$ mol/mm², unter der Verwendung des RecA-Puffers konnte nur ein Resonanzsignal von 8 RU gemessen werden.

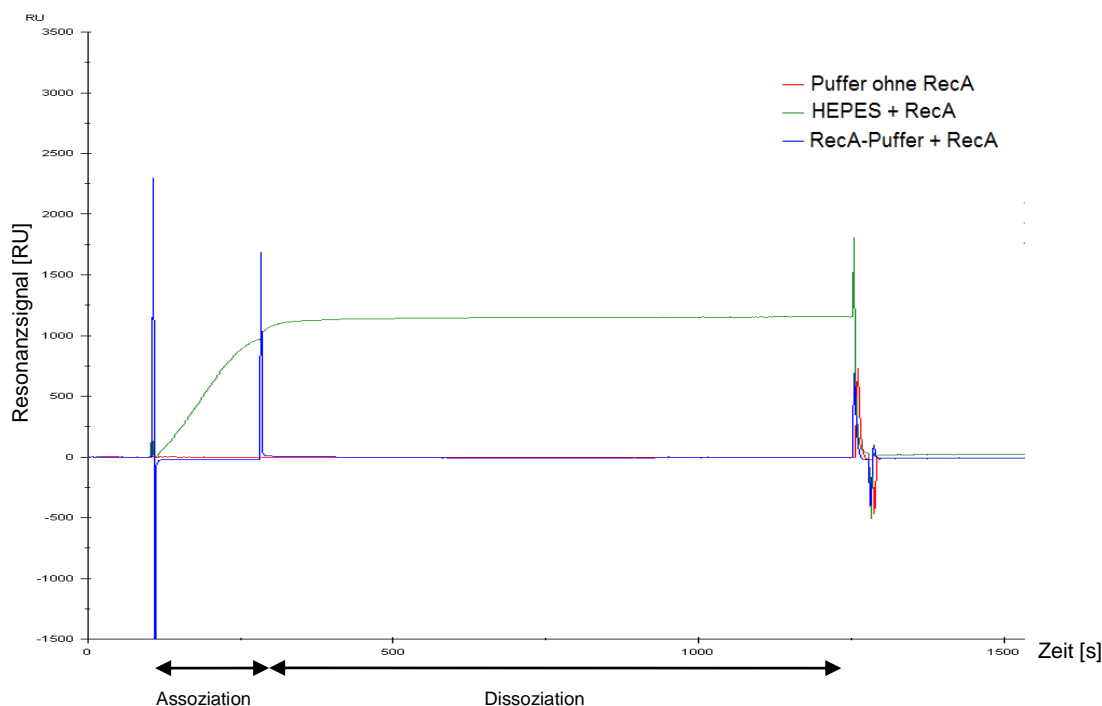


Abbildung 31 Einfluss unterschiedlicher Puffer auf die Bindung zwischen RecA und dsDNA

Der grüne Kurvenverlauf zeigt die Bindung der RecA an dsDNA in HEPES-Puffer. Die blaue Kurve stellt die Reaktion in RecA-Puffer dar und rosa die Reaktion ohne RecA.

5.3.3.2 Bindungskinetik der RecA an ssDNA

Auf Fließzelle 1 konnten 761 RU Streptavidin durch die Aktivierung gebunden werden. Das entsprach $7,6 \cdot 10^9$ mol/mm². An dieser Oberfläche wurde 187 RU ssDNA gebunden. Bei einzelsträngiger DNA entsprechen 1000 RU 0,78 ng/mm² [Meyer, 2002]. Ausgehend von einem Molekulargewicht der ssDNA von 7582 g/mol wurden $1,159 \cdot 10^{10}$ mol/mm² ssDNA auf der Oberfläche gebunden. Das ergab ein Verhältnis von Streptavidin zu DNA von 1:(1,5). An diese Oberfläche konnte anschließend nur wenig RecA gebunden werden, die Signalstärke nach der Überströmung betrug nur 28 RU. Das entsprach $4,5 \cdot 10^8$ Molekülen RecA pro mm². Das Verhältnis der Bindung zwischen ssDNA und RecA betrug 26:1. Die Verwendung des RecA-Puffers zeigte eine leichte Verbesserung der Bindung, mit $1,0 \cdot 10^9$ mol/mm² und einem Verhältnisses von 11:1. Die vorherige Inkubation der RecA mit dsDNA zeigte das gleiche Ergebnis. Unter Verwendung des

RecA-Puffers wurden $3,3 \cdot 10^8$ Moleküle gebunden, ohne RecA-Puffer $1,0 \cdot 10^9$ mol/mm². Somit war die Bindung der RecA an ssDNA bei der Inkubation in RecA-Puffer besser als bei der in HEPES-Puffer. Die vorherige Inkubation mit doppelsträngiger DNA zeigte keinen Unterschied im Bindungsverhalten.

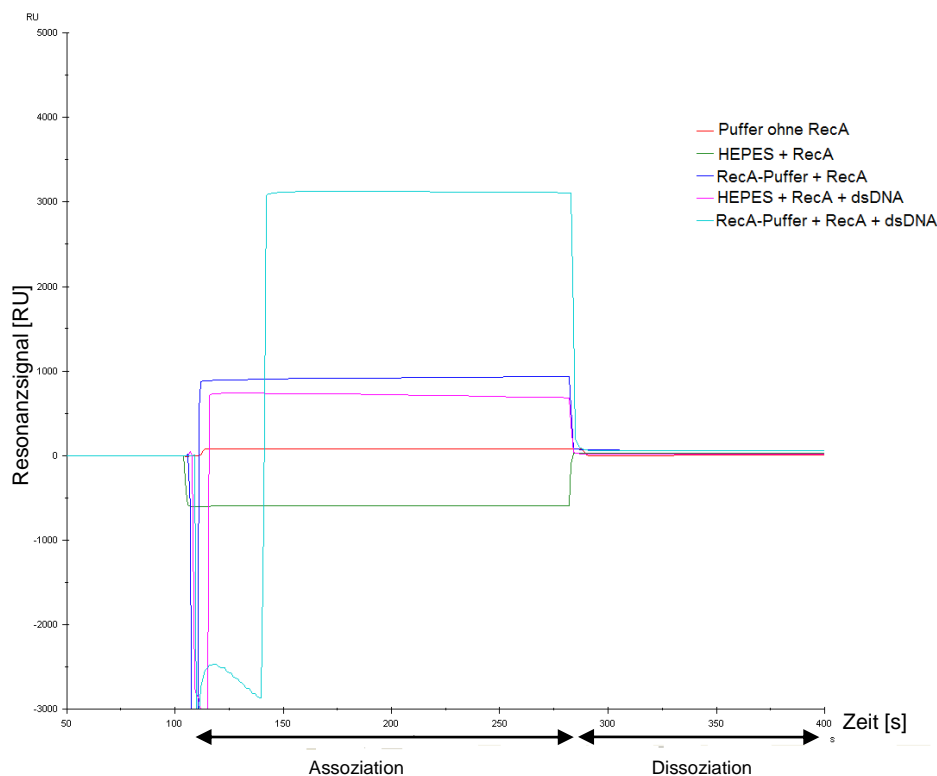


Abbildung 32 Bindungskinetik der RecA an ssDNA

Die Abbildung zeigt ein Sensogramm der Bindung der RecA an ssDNA. Die rote Kurve zeigt den Verlauf ohne RecA, grün die RecA in HEPES-Puffer, bei der blauen Kurve wurde RecA-Puffer verwendet, die rosa Kurve zeigt den Verlauf bei der Anwesenheit von dsDNA in HEPES-Puffer und Türkis zeigt die RecA mit dsDNA in RecA-Puffer. Nach der Assoziation wurde nur sehr wenig RecA an die ssDNA gebunden. Die Unterschiede sind in dem Sensogramm kaum erkennbar und befanden sich in einem Bereich von 20 bis 68 RU.

6 Diskussion

In diesem Kapitel werden die durchgeführten Methoden ausgewertet. Die getesteten isothermalen Amplifikationsmethoden werden in Hinblick auf die Anwendbarkeit in einem Teststreifensystem diskutiert. Die Anwendbarkeit der RecA zur Spezifizierung der amplifizierten Produkte durch den Einbau einer Sonde wird durch die erhaltenen Testresultate beurteilt.

6.1 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Die LAMP ist eine isothermale Amplifikationsmethode, bei der durch den Einsatz von vier Primern viele unterschiedlich lange Amplifikationsprodukte entstehen. Für die LAMP ist der Zeitaufwand für das Pipettieren der Ansätze hoch. Die Firma Eiken bietet ein „Loopamp DNA Amplification kit“ an, das entsprechende Primersätze und alle Amplifikationsreagenzien enthält. Dadurch verkürzt sich die Probenvorbereitungszeit und die Kontaminationsgefahr sinkt. Untersuchungen zur Inkubationstemperatur haben gezeigt, dass der Erfolg der Amplifikation sehr temperaturabhängig ist und Änderungen der Inkubationstemperatur von einem Grad Celsius können dazu führen, dass kein Produkt amplifiziert wird. Die Reaktionszeit ist mit 90 Minuten sehr hoch. Durch den Einsatz von zwei weiteren LAMP-Primern konnte diese auf 60 Minuten verkürzt werden. Auch die Sensitivität hat sich dadurch verbessert. Die Detektion der Ergebnisse mittels Elektrophorese ist kontaminationsanfällig, da die Probe nach der Amplifikation geöffnet werden muss. Die Zugabe des fluoreszierenden Metallindikator Calcein stellte sich als eine einfache und zuverlässige Methode der Ergebnisauswertung heraus. Nachteilig ist jedoch die Notwendigkeit einer UV-Lampe mit entsprechendem Augenschutz. Bei der Verwendung von HNB konnte das Ergebnis mit bloßem Auge abgelesen werden. Die Inkubationszeit war jedoch etwas länger, wodurch nur eine geringe Zeitersparnis im Vergleich zur konventionellen PCR erreicht werden konnte. Die Tests zur Sensitivität haben gezeigt, dass die LAMP vergleichbare Mengen DNA detektieren konnte wie eine herkömmliche PCR. Die Sensitivität war abhängig von der Detektionsmethode, bei der Verwendung von Calcein konnte eine höhere Sensitivität nachgewiesen werden als bei der HNB-Detektion. [Goto et al 2009] zeigten jedoch, dass bei ihren Tests die Sensitivität bei der HNB-Detektion 10fach höher war als bei der Calceinmethode. Auch war der farbliche Unterschied zwischen positiven und negativen Proben viel deutlicher erkennbar. [Misawa, 2007] beschreibt eine weitere Detektionsmethode, die mit Hilfe einer einfachen Trübungsmessung möglich ist. Es wurde gezeigt, dass hierbei ebenfalls eine vergleichbare Mengen MRSA-DNA detektiert werden kann. Unter Verwendung des

„Loopamp DNA Amplification kit“ wurde hierbei die Trübung nach der Amplifikation mittels Turbidimeter gemessen.

6.2 Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

Die RPA ist eine sehr schnelle isothermale Amplifikationsmethode, bei der in kürzester Zeit viel DNA amplifiziert wird. Durch die Verwendung des TwistAmp™ Kit der Firma TwistDX ist die Probenvorbereitungszeit gering, es muss lediglich Puffer, Primer und die Probe zu dem lyophilisierten Reagenz hinzugefügt werden. An der vervielfältigten DNA sind nach der Amplifikation noch Proteine gebunden, die laut Hersteller am besten durch ein DNA Aufreinigungskit entfernt werden müssen, bevor eine elektrophoretische Auftrennung möglich ist. Dies verursachte zusätzliche Kosten und erhöhte den Zeitaufwand. Durch die damit verbundene Entnahme des amplifizierten Produktes und Überführung in die Aufreinigungssäule bestand eine hohe Kontaminationsgefahr. Der Test zur Denaturierung störender Proteine hat gezeigt, dass die Zugabe von Proteinase K eine ebenfalls sehr wirkungsvolle Methode war, um das amplifizierte Produkt anschließend mittels Elektrophorese darstellen zu können. Der Aufwand, die Kosten und die Kontaminationsgefahr sind dabei um ein vielfaches geringer als bei der Verwendung eines kommerziellen Aufreinigungskits.

Ein wichtiges Qualitätskriterium einer Amplifikationsmethode ist die Sensitivität. Ziel ist die Detektion möglichst geringer DNA-Mengen. Die Nachweisgrenze der RPA bei der Detektion mittels Elektrophorese lag bei 0,05 ng DNA. Dieser Wert war Vergleichbar mit einer konventionellen PCR. Die optimale Inkubationstemperatur der RPA lag bei 37 °C, es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Amplifikation auch bei niedrigeren Temperaturen möglich ist. Die minimale Temperatur, bei der noch Produkt amplifiziert wurde, lag bei 30 °C. Somit ist eine Reaktion bei Raumtemperatur nicht möglich und das Teststreifensystem müsste auch bei dieser Methode ein integriertes Heizsystem enthalten. Untersuchungen zur Inkubationszeit haben gezeigt, dass bereits nach 10 Minuten eine detektierbare Menge Produkt amplifiziert wurde. Dies ist im Vergleich zur herkömmlichen PCR sehr schnell. Die optimale Zeit lag bei 20-30 Minuten. Längere Inkubationszeiten führten zur Amplifikation unspezifischer DNA, was die Notwendigkeit einer Sonde zur Erhöhung der Spezifität verstärkt. Dazu wurde die Fluoreszenzsonde SATamra getestet [Piepenburg et al, 2006]. Diese erzeugte jedoch bei positiven Proben nur ein schwaches Fluoreszenzsignal. Ob die Ursache an der Sonde selbst oder an der eingesetzten DNA lag, war nicht zu überprüfen.

Bei der Untersuchung der Lagerungsstabilität wurde gezeigt, dass eine Lagerung sowohl bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur über 8 Wochen möglich ist, ohne dass die Funktionsfähigkeit der lyophilisierten Reagenzien stark beeinträchtigt wird. Die Aufbewahrung bei Raumtemperatur zeigte keinen Unterschied in der Menge des amplifizierten Produkts. Die Proben, die bei 4 °C gelagert wurden, wiesen nach vier und nach acht Wochen eine kleine Verschlechterung in der Bandenstärke auf.

6.3 RecA

Um die RecA für den Einbau einer Oligonukleotidsonde in ein amplifiziertes Produkt nutzen zu können, wurden verschiedene Tests zur Aufklärung der Bindungskinetik an dsDNA und ssDNA durchgeführt.

Die Untersuchungen zur Bindungskinetik der RecA an dsDNA haben ergeben, dass die Bindung eine große Abhängigkeit vom verwendeten Reaktionspuffer zeigte. Bei dem Electrophoretic Mobility Shift Assay wurde festgestellt, dass die Verwendung des RecA-Puffers die Bindung der RecA an dsDNA verschlechterte. Dieses Ergebnis wurde durch die Analyse am BIAcore bestätigt. Die Analyse über den Einfluss der einzelnen Bestandteile des RecA-Puffers zeigte, dass sowohl die enthaltenen $MgCl_2$ -Ionen als auch der Tris-HCl-Puffer einen negativen Einfluss auf die Bindung bewirkten. Der Verdacht, dass die bessere Bindung der RecA bei Abwesenheit des RecA-Puffers durch eine pH-Wert-Verschiebung zustande kommt, konnte durch die Verwendung eines anderen Puffers mit gleichem pH-Wert widerlegt werden. Bei [Sattin et al, 2004] wurde die gleiche Beobachtung gemacht, jedoch wurde darauf nicht näher eingegangen.

Die Messung der Bindungskinetik am BIAcore ergab ein Bindungsverhältnis zwischen RecA und dsDNA in HEPES-Puffer von 1:29. Somit binden 29 RecA-Proteine an einem DNA-Molekül. Dieser Wert ist niedriger als in der Literatur beschrieben, da theoretisch 3 bp pro RecA-Molekül gebunden werden [Kowalczykowsk et al, 1991]. Ausgehend von der Länge der gebundenen DNA von 400 bp, könnte daher das Verhältnis maximal 1:133 sein. Durch die Verwendung des RecA-Puffers wurde die Bindung wesentlich verschlechtert. Es wurde nur eine minimale Bindung der RecA and dsDNA in diesem Reaktionsmilieu nachgewiesen. Die Messung der Bindungskinetik der RecA bei vorheriger Inkubation mit einer spezifischen Oligonukleotidsonde ergab, dass sich die Bindungsmenge verringert hat. Im Vergleich zur freien RecA hat sich das Bindungsverhältnis von 1:29 auf einen Wert von 1:(8,5) verschlechtert. Doch es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung der spezifischen Sonde eine bessere Bindung

bewirkt als die unspezifische Sonde. Das Bindungsverhältnis zwischen RecA und dsDNA mit der unspezifischen Sonde verringerte sich auf 1:(3,5). Da die Länge und die Konzentration der verwendeten Oligonukleotide identisch waren, könnte man postulieren, dass die Bindungsaffinität eines spezifischen ssDNA/RecA-Filaments zur dsDNA besser ist als die eines unspezifischen.

Die Bindung der RecA an ssDNA konnte über das EMSA nicht nachgewiesen werden. Das verwendete Oligonukleotid war mit einer Länge von 30 bp möglicherweise zu kurz und die Methode nicht sensitiv genug, um eine Bindung nachweisen zu können. [Ziemenowicz et al, 2010] beschreibt in ihrem Artikel die Wirkung von CaCl_2 , NaCl und NH_4NO_3 in Kombination mit dem pH-Wert und Nucleotid-Cofaktoren auf die ssDNA-bindende Aktivität der RecA. Unter Verwendung des EMSA und einem 5386 Basenpaar langem ssDNA-Strang wurde gezeigt, dass diese Salze zusätzlich zu der inhibitorischen Wirkung auch eine stimulierende Wirkung auf die RecA haben. Diese Effekte treten nur unter sehr strengen Bedingungen auf und das Vorhandensein oder Fehlen und die Art der Nukleotid-Cofaktoren (ATP/ ATP γ S) spielen dabei eine große Rolle. Es wurde beobachtet, dass im Gegensatz zu ATP, ATP γ S die Hemmwirkung von NaCl und NH_4NO_3 verhindert, selbst bei hohen Salzkonzentrationen. Diese Ergebnisse zeigen, dass ATP γ S wahrscheinlich die Struktur von RecA stabilisiert, wodurch es resistent gegenüber hohen Salzkonzentrationen wird. Die schlechtere Bindung der RecA an ssDNA konnte mit der Messung am BIAcore bestätigt werden. Nur an jedem 26. Oligonukleotid hat sich ein RecA Protein angelagert. In der Literatur wird das stöchiometrische Bindungsverhältnis mit 3 Nukleotide pro RecA Protein beschrieben. [Kowalczykowsk et al, 1991]. Dieser Wert weicht deutlich von den Ergebnissen am BIAcore ab. Grund dafür könnten sterische Behinderungen sein, die dazu führen, dass die RecA nur schlecht binden kann. Bei den Experimenten am BIAcore lag das DNA- Molekül, im Vergleich zu in der Literatur beschriebene Verfahren, oberflächengebunden statt frei in Lösung vor. Ein weiterer Grund könnte auch das Nichterreichen der optimalen Bindungsbedingungen in Bezug auf Salzkonzentrationen sein. [Bar et al, 2000] zeigt, dass die anfängliche Bindung der RecA an ssDNA empfindlich auf verschiedene Parameter, wie Sequenzlänge und Salz ist. Weiter spielt auch die Sequenz selber eine Rolle, RecA bindet besser an pyrimidinreichen Regionen und Sequenzen mit minimaler Sekundärstruktur. Die Bindung der RecA an ssDNA erfolgt sequenzunabhängig, jedoch zeigt [Dutreix, 1997], dass die RecA bevorzugt an Wiederholungen der Basenabfolge GT und CA bindet.

Die Stabilisierung des RecA-ds/ssDNA-Komplexes durch eine RNA-Sonde konnte am BIAcore nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigte der Nachweis markierter

Oligonukleotide auf silanisierten und Streptavidin-beschichteten Objektträgern, dass bei Anwesenheit der RNA ein höheres Fluoreszenzsignal messbar war. Dieses Ergebnis sollte jedoch reproduziert werden, um die Aussagekraft zu verbessern. [Rice et al, 2012] zeigen durch die Fluoreszenzmarkierung der Oligonukleotidsonde und der stabilisierenden RNA, dass bei Abwesenheit der RNA stabiler Komplex geformt wird und der Einbau der Sonde nachgewiesen werden kann. Bei der Verwendung der RNA werden sowohl die Oligonukleotidsonde als auch die RNA in die duplex-DNA eingebaut und formen einen stabilen Komplex. Dadurch könnte auch die Sensitivität verbessert werden, da die RecA-vermittelte Homologiesuche Mismatches erlaubt, die Toleranz beträgt dabei bis zu 30 % [Morel et al. 1994].

7 Ausblick

Damit die LAMP in einem Teststreifensystem zum Einsatz kommen kann, müssen die Reagenzien in einer lyophilisierten Form vorliegen. Dazu müssten Tests zeigen, ob die Funktionalität nach der Lyophilisation noch gegeben ist. Weiter sollten Versuche zur Spezifität der Methode durchgeführt werden. Da nach der Amplifikation keine Sonde hybridisiert werden kann, weil viele unterschiedlich lange Produkte entstehen, muss gezeigt werden, ob der Einsatz der vier bzw. sechs Primer eine genügend hohe Spezifität garantiert. Als einzig mögliche Methode der Detektion auf einem Teststreifensystem kommt nur die Visualisierung mit HNB in Frage. Auch die hohe Inkubationstemperatur und -zeit stellen ein Problem dar.

Die RPA ist eine sehr schnelle Amplifikationsmethode, jedoch entsteht bei längerer Inkubationszeit unspezifisches RPA-Produkt. Daher ist die Verwendung einer spezifischen Sonde zur Vermeidung falsch-positiver Resultate ratsam. Da die SATamra-Sonde nicht die erhofften Testergebnisse erbrachte, sollte eine andere Möglichkeit gefunden werden, die amplifizierten Produkte zu spezifizieren. Des Weiteren sollte der Test zur Lagerungsstabilität fortgesetzt werden, um zu zeigen, ob eine Lagerung bei Raumtemperatur bzw. im Kühlschrank über einen längeren Zeitraum als acht Wochen möglich ist.

Die Bindungskinetik der RecA muss noch weiter charakterisiert werden, um eine Aussage über die Anwendbarkeit zum Einbau einer Sonde treffen zu können. Weitere Messungen am BIAcore sind notwendig, um die optimalen Bindungsbedingungen der RecA an ssDNA und dsDNA herauszufinden. Dazu sollten unterschiedliche Konzentration an verschiedenen Salzen (MgCl_2 , CaCl_2 , NaCl) und pH-Wertveränderungen untersucht werden. Des Weiteren sollte die Notwendigkeit des Einzelstrangbindenden Proteins (SSB) beim Strangaustausch der RecA getestet werden, da es bei der RecA-Filamentbildung unterstützend wirkt [Roy et al, 2009]. Weiter muss gezeigt werden ob nach dem Einbau der Sonde eine Denaturierung der RecA notwendig ist, denn es besteht die Möglichkeit, dass die RecA nur mit der Sonde an den Doppelstrang bindet, ohne diese einzubauen. Weitere Tests müssen zeigen, ob die Homologiesuche der RecA eine ausreichend hohe Spezifität liefert.

8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die zwei isothermalen Amplifikationsmethoden RPA und LAMP in Hinblick auf ihre Anwendbarkeit in einem Teststreifensystem charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die RPA aufgrund der kurzen Inkubationszeit und der geringeren Reaktionstemperatur als die geeignetere Methode erscheint. Die LAMP benötigte eine höhere Inkubationszeit, auch durch die Verwendung von zwei zusätzlichen Primern konnte diese von 90 Minuten nur auf 60 Minuten reduziert werden. Die Visualisierung mit dem fluoreszierenden Metallindikator Calcein zeigte gute Testresultate, jedoch wird zur Darstellung der Ergebnisse ein UV-Gerät benötigt. Die HNB-Methode konnte mit dem bloßen Auge detektiert werden, aber sie lieferte keine zuverlässigen Ergebnisse. Die Testergebnisse zur Charakterisierung der RPA zeigten, dass bei dieser Technik sehr schnell Produkt amplifiziert wurde. Die minimale Inkubationstemperatur lag bei 30 °C und die Sensitivität war vergleichbar mit einer konventionellen PCR. Tests zur Inkubationszeit zeigten, dass bereits nach 10 Minuten Produkt amplifiziert wurde, jedoch war bei einer Inkubationszeit über 40 Minuten die Bildung von unspezifischem Produkt nachweisbar. Um die Spezifität der RPA zu erhöhen wurde die Anwendung einer speziellen Fluoreszenzsonde getestet. Diese zeigt jedoch nur ein geringes Signal bei positiven Proben. Ein Test zur Lagerungsstabilität der lyophilisierten Reagenzien zeigte, dass eine Lagerung bei Raumtemperatur und im Kühlschrank bis zu acht Wochen möglich sind, ohne dass es zu einem Verlust der Funktionalität kommt. Um die Spezifität des Teststreifensystems zu erhöhen, wurde ein Konzept entwickelt, mit dem eine Sonde in ein amplifiziertes Produkt eingebaut werden soll. Dazu soll das Enzym RecA genutzt werden, da es in der Lage ist an einzelsträngige DNA zu binden. Mit diesem als RecA-Filament bezeichneten Komplex führt sie eine Homologiesuche in doppelsträngige DNA durch. Findet sie den komplementären Strang, baut sie die markierte ssDNA ein. Um die Anwendbarkeit und Bindungskinetik der RecA zu charakterisieren, wurden verschiedene Tests am BIAcore durchgeführt. Gezeigt wurde, dass die RecA sehr gut an dsDNA bindet, in Abhängigkeit des Reaktionsmilieus. Bei vorheriger Inkubation mit einer Oligonukleotidsonde zur Filamentbildung verringert sich die Bindungskapazität. Jedoch konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung einer spezifischen Sonde eine bessere Bindung erreicht wurde als bei einer unspezifischen. Die stabilisierende Wirkung einer zusätzlichen RNA-Sonde konnte am BIAcore nicht gezeigt werden, aber der Nachweis von markierten Oligonukleotide auf Streptavidin-beschichteten Objektträgern gab Hinweise darauf, dass eine Stabilisierung stattgefunden hat. Die Bindung der RecA an

ssDNA konnte mit der Methode des Gelshifts nicht nachgewiesen werden. Die Versuche am BIAcore zeigten auch nur eine sehr geringe Bindung. Grund dafür könnte das zu kleine Oligonukleotid sein, was verwendet wurde, oder die optimalen Bindungsumgebungen wurden nicht erreicht. Ob die RecA zur Hybridisierung einer Oligonukleotidsonde geeignet ist, konnte in dieser Arbeit weder widerlegt noch bestätigt werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die RPA als Methode der Wahl empfohlen werden kann, um die weitere Teststreifenentwicklung fortzusetzen. Die Methode zeigte sich ausreichend sensitiv und läuft nachweisbar in wenigen Minuten bei Temperaturen ab 30 °C ab. Die lyophilisierten Reaktionskomponenten waren auch bei Raumtemperatur über einem längeren Zeitraum stabil. Zur Spezifizierung der Methode sollten weitere Tests vorgenommen werden, die den Nachweis erbringen, ob eine Sondenhybridisierung mit Hilfe der RecA möglich ist.

Literaturverzeichnis

Bar-Ziv, Roy; Libchaber, Albert (2001): *Effects of DNA sequence and structure on binding of RecA to single-stranded DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences Vol. 98/16. 9068-9073.

Barnes WL, Dereux A, Ebbesen TW. (2003): *Surface plasmon subwavelength optics*. Nature Vol. 424. 824-830.

Brandt Ole (2004): *Markierungsfreie DNA-Mikrochip Analytik*. Berlin, Technischen Universität Berlin, Fakultät III – Prozesswissenschaften, Dissertation.

Brandt, Ole; Feldner, Julia; Stephan, Achim; Schröder, Markus; Schnölzer, Martina; Arlinghaus, Heinrich F.; Hoheisel, Jörg D.; Jacob, Anette (2003): *PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA samples*. Nucleic Acids Research Vol. 31. No. 19 e119.

Chen, Zhucheng; Yang, Haijuan; Pavletich, Nikola P. (2008): *Mechanism of homologous recombination from the RecA–ssDNA/dsDNA structures*. Nature Vol. 453. 489-494.

Cox, Michael M.; Lehman, I.R. (1981): *RecA protein of Escherichia coli promotes branch migration, a kinetically distinct phase of DNA strand exchange*. Proceedings of the National Academy of Sciences Vol. 78. 3433-3437.

Cunningham, R.P., Shibata, T., DasGupta, C., and Radding, C.M. 1979. *Single strands induce recA protein to unwind duplex DNA for homologous pairing*. Nature Vol. 281. 191-195.

Dutreix, Marie (2000): *(GT)_n Repetitive Tracts Affect Several Stages of RecA-promoted Recombination*. Journal of Molecular Biology Vol. 273. 105–113.

Gamper, H.B., Nulf, C.J., Corey, D.R., and Kmiec, E.B. 2003. *The synaptic complex of RecA protein participates in hybridization and inverse strand exchange reactions*. Biochemistry 42. 2643-2655.

Goto, Motoki; Honda, Eiichi; Ogura, Atsuo; Nomoto, Akio; Hanaki, Ken-Ichi (2009): *Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification. reaction by using hydroxy naphthol blue*. BioTechniques Vol. 46. 167-172.

Green, NM (1975): *Avidin*. Advances in Protein Chemistry Vol. 29. 85-133.

Hellman Lance M.; Fried, Michael G.(2007): *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions*. Nature Protocols Vol. 2. 1849 – 1861.

Hillebrand, Timo; Graser, Elmar (2010): *Method and rapid test for detection of specific nucleic acid sequences*. Publication date: 2010-09-02 ,Patent application number: 20100221718.

Kowalczykowski, Stephen C.; Krupp, Renee (1995): *DNA-strand exchange promoted by RecA protein in the absence of ATP: Implications for the mechanism of energy transduction in protein-promoted nucleic acid transaction*. Proceedings of the National Academy of Sciences Vol. 92. 3478-3482.

Ma, Xue-jun; Shu, Yue-long; Nie, Kai; Qin, Meng; Wang, Da-yan; Gao; Rong-bao; Wang, Miao; Le-ying Wen, Feng Han, Shu-mei Zhou, Xiang Zhao, Yan-hui Cheng, De-xin Li, Xiao-ping Dong (2010): *Visual detection of pandemic influenza A H1N1 Virus 2009 by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye*. Journal of Virological Methods 167. 214–217.

Meyer, Heiko (2002): *Surface Plasmon Resonance- Biosensoren in der Proteomanalyse und der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung*. BIOSpektrum Proteomics & Drug Development Vol. 8. 532-535.

Misawa, Yoshiki; Yoshida, Atsushi; Saito, Ryoichi; Yoshida, Honami; Okuzumi, Katsuko; Ito, Nobue; Okada, Mitsumasa; Moriya, Kyoji; Koike, Kazuhiko (2007): *Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) on blood cultures*. J Infect Chemother 13. 134–140.

Morel, P., Stasiak, A., Ehrlich, S.D., and Cassuto, E. (1994): *Effect of length and location of heterologous sequences on RecA-mediated strand exchange*. Journal of Molecular Biology Vol. 269. 19830-19835.

Mori, Yasuyoshi; Notomi, Tsugunori (2009): *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases*. J Infect Chemother Vol. 15. 62–69.

Piepenburg, Olaf; Williams, Colin H; Stemple, Derek; Armes, Niall A (2006): *DNA Detection Using Recombination Proteins*. PLoS Biol. Vol. 4. 204-211.

Rigas, Basil; Welcher, Andrew A.; Ward, David C.; Sherman, Weissman M. (1986): *Rapid plasmid library screening using RecA-coated biotinylated probes*. . Proceedings of the National Academy of Sciences Vol. 83. 9591-9595.

Roy, Rahul; Kozlov, Alexander; Lohman, Timothy M.; Ha, Taekjip (2009): *SSB protein diffusion on single-stranded DNA stimulates RecA filament formation*. Nature 461. 1092-1097.

Tomita, Norihiro; Mori, Yasuyoshi; Kanda, Hidetoshi; Notomi, Tsugunori (2008): *Loop mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products*. Nature Protocols 3. 877-832.

Xua, Zhenbo; Lia, Chuc; Lin Jin; Peters, Brian M.; Harris, Megan L.; Bing Lia; Shia, Lei; Shirliff, Mark E. (2011): *Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays on rapid detection of various types of staphylococci strains*. Food Research International Vol. 47. 166-173.

Ziemienowicz, Alicja; Mohammad, Seyed; Rahavi, Reza; Kovalchuk, Igor (2010): *The stimulatory effect of CaCl₂, NaCl and NH₄NO₃ salts on the ssDNA-binding activity of RecA depends on nucleotide cofactor and buffer pH*. BMB Reports Vol. 44. 341-346.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 31.08.2012

Judith Rasser